

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**FISIOPATOLOGÍA DEL RECEPTOR
PLAQUETARIO DE FIBRINÓGENO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena García Arias-Salgado

Bajo la dirección del doctor

Roberto Parrilla Sánchez

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1690-3

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**FISIOPATOLOGÍA DEL RECEPTOR PLAQUETARIO
DE FIBRINÓGENO**

Tesis presentada por
ELENA GARCÍA ARIAS-SALGADO
para optar al grado de doctor

VºBº Director de Tesis

VºBº Tutor de Tesis

Doctorando

Fdo. Dr. Roberto Parrilla Sánchez

Fdo. Dra. Alicia Megías Fresno

Fdo. Elena García Arias-Salgado

Departamento de Fisiopatología y Genética Molecular Humana
Velázquez 144
28006-Madrid, SPAIN
Tfno./FAX: 91-5628025
Tfno.: 91-5644562 Ext. 4204
e-mail: rparrilla@cib.csic.es

ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA,

INFORMA QUE:

El trabajo de la tesis titulada:

"Fisiopatología del receptor plaquetario de fibrinógeno"

presentado por Elena García Arias-Salgado, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Fisiopatología y Genética Molecular Humana del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y, en mi opinión, reúne todos los requisitos necesarios para poder optar al grado de Doctor en Biología.

Para que así conste, firmo la presente en Madrid a 16 de Febrero de 2001

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Roberto Parrilla, director de esta tesis, por la oportunidad que me ha brindado para la realización de este trabajo en el Departamento de Fisiopatología y Genética Molecular Humana del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), por su buena dirección y su generosa ayuda.

Mi agradecimiento a la Dra. Consuelo González-Manchón por su inestimable supervisión, y al resto de compañeros del laboratorio, especialmente a Nora Butta, por su cooperación y estímulo durante estos años. A los distintos servicios técnicos del CIB, por la competente y buena labor realizada, en particular a: Pedro (Citometría de flujo); Asunción, Gracia y Sonia (Secuenciación); Javier y Emilia (Química de proteínas).

También agradezco la tutoría y las facilidades prestadas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid durante este importante período de mi formación científica.

Al Dr. José González, a la Dra. M^a Victoria Álvarez y a la Dra. Linda Hendershot por facilitarnos anticuerpos monoclonales. Al centro de hemodonación de la Comunidad de Madrid, a los hospitales, y familias que colaboraron amable y desinteresadamente en este estudio.

Mi gratitud a la Fundación Ramón Areces por la concesión de la beca que me ha permitido realizar esta tesis doctoral.

El trabajo experimental ha sido financiado parcialmente por ayudas de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT PB97-1240), Plan Nacional de I+D (SAF2000-0127), Fondo de Investigaciones Sanitarias (96/2014), y Comunidad Autónoma de Madrid 08.4/0031/1998.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Morfología y función plaquetarias.....	2
1.1.1. Morfología plaquetaria.....	2
1.1.2. Fisiología plaquetaria: Hemostasia.....	5
1.1.3. Alteraciones congénitas de la función plaquetaria.....	8
1.2. Integrinas.....	10
1.2.1. Estructura de las integrinas.....	11
1.2.2. Función de las integrinas.....	13
1.2.2.1. Sitios de reconocimiento de ligandos.....	14
1.2.2.2. Sitios de unión de las integrinas.....	14
1.2.2.3. Señalización bidireccional de las integrinas.....	15
1.2.3. Regulación de las integrinas.....	17
1.2.3.1. Regulación de los niveles de expresión.....	17
1.2.3.2. Regulación de la función de integrinas por cationes divalentes.....	17
1.2.3.3. Regulación de las integrinas por la especificidad celular.....	18
1.2.3.4. Regulación de las integrinas por modulación de la afinidad.....	19
1.3. Integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa).....	21
1.3.1. Estructura de los genes de GPIIb y GPIIIa.....	21
1.3.2. Estructura de las glucoproteínas GPIIb y GPIIIa.....	24
1.3.3. Biosíntesis de GPIIb/IIIa.....	25
1.3.4. Función de GPIIb/IIIa.....	28
1.4. Patología del receptor de fibrinógeno: Tromboastenia de Glanzmann.....	30
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Extracción de DNA genómico.....	38
3.2. Extracción de RNA total.....	38
3.3. Diseño de oligonucleótidos y sondas.....	39
3.4. Amplificación, clonación y secuenciación de DNA genómico y cDNA.....	43
3.5. Análisis de polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (SSCP).....	44
3.6. Amplificación específica de alelos mediante PCR (ASPCR).....	44
3.7. Valoración del contenido plaquetario de GPIIb, GPIIIa y fibrinógeno.....	45
3.7.1. Enzimoimmunoensayo.....	45
3.7.2. Análisis de western.....	45
3.7.3. Citometría de flujo.....	46
3.8. Cuantificación de RNAs mensajeros de GPIIb y GPIIIa.....	46
3.9. Clonación de los cDNAs de GPIIb y GPIIIa en vectores de expresión.....	49
3.9.1. Construcción de vectores de expresión con las formas mutantes de cDNA de GPIIb.....	49
3.9.2. Clonación de los cDNAs de GPIIIa normal o mutante en vectores de expresión.....	50

3.10. Expresión de GPIIb y GPIIIa en células CHO.....	52
3.10.1. Transfecciones transitorias.....	52
3.10.2. Transfecciones estables.....	53
3.11. Detección de GPIIb y GPIIIa en células transfectadas.....	53
3.11.1. Citometría de flujo.....	53
3.11.2. Marcaje con biotina e inmunoprecipitación de GPIIb y/o GPIIIa.....	53
3.12. Análisis de pulso y caza para determinar la estabilidad de complejos GPIIb/IIIa mutantes.....	54
3.13. Detección de proteína chaperona (BiP) asociada a GPIIb y/o GPIIIa.....	55
3.14. Inducción de la diferenciación de la línea celular megacarioblástica humana MEG-01.....	55
3.15. Ensayos de activación del receptor de fibrinógeno en plaquetas.....	56
3.15.1. Marcaje de fibrinógeno con fluoresceína.....	56
3.15.2. Unión de fibrinógeno o PAC-1 a plaquetas activadas.....	56
3.16. Ensayos de adhesión celular a fibrinógeno inmovilizado.....	57
3.17. Ensayos de agregación en presencia de fibrinógeno con células CHO transfectadas.....	57
4. RESULTADOS	
4.1 Patologías moleculares asociadas a fenotipos tromboasténicos tipo II.....	60
4.1.1. Mutación Cys ⁶⁷⁴ →Arg en el exón 21 de GPIIb.....	60
4.1.1.1. Datos clínicos.....	60
4.1.1.2. Contenido de GPIIb y GPIIIa en plaquetas.....	60
4.1.1.3. Identificación de mutaciones en GPIIb.....	63
4.1.1.4. Cuantificación y análisis del RNA mensajero de GPIIb y GPIIIa en plaquetas.....	66
4.1.1.5. Expresión heteróloga de las formas normal y mutante de GPIIb en células de mamífero.....	68
4.1.1.6. Análisis de pulso y caza para el estudio de la estabilidad de los complejos [674R]GPIIb/IIIa.....	71
4.1.1.7. Asociación de la proteína chaperona BiP a la subunidad GPIIb mutante.....	73
4.1.1.8. Mutagénesis del puente disulfuro 674-687 de GPIIb.....	73
4.1.1.9. Fijación de fibrinógeno y PAC-1 a plaquetas portadoras de complejos [674R]GPIIb/IIIa mutantes.....	77
4.1.1.10. Coexpresión de GPIIb normal y [674R]GPIIb mutante.....	77
4.2. Patologías moleculares asociadas a fenotipos tromboasténicos tipo I.....	82
4.2.1. Mutación [288delC]GPIIb.....	82
4.2.1.1. Datos clínicos.....	82
4.2.1.2. Niveles de GPIIb y GPIIIa en plaquetas.....	82
4.2.1.3. Detección de mutaciones en GPIIb.....	84
4.2.1.4. Análisis de los productos de transcripción de fragmentos del gen GPIIb normal y [288delC]GPIIb mutado mediante el vector Exontrap.....	88
4.2.1.5. Cuantificación y análisis de RNA mensajeros de GPIIb y GPIIIa en plaquetas.....	88
4.2.1.6. Expresión heteróloga de GPIIb normal y [288delC]GPIIb mutante en células CHO.....	91

4.2.2. Mutación Arg ⁵⁹⁷ → Stop en el exón 19 de GPIIb.....	93
4.2.2.1. Datos clínicos	93
4.2.2.2. Contenido plaquetario de GPIIb y GPIIIa.....	93
4.2.2.3. Localización de mutaciones en GPIIb	97
4.2.2.4. Cuantificación del RNAm de GPIIb y GPIIIa en plaquetas.....	97
4.2.2.5. Expresión heteróloga de GPIIb[Δ597] en células CHO-IIIa.....	101
4.2.3. Mutación Glu ³²⁴ → Lys en el exón 12 de GPIIb	104
4.2.3.1. Datos clínicos	104
4.2.3.2. Contenido plaquetario de GPIIb y GPIIIa.....	104
4.2.3.3. Identificación de la mutación de GPIIb responsable del fenotipo tromboasténico	107
4.2.3.4. Cuantificación de RNAm de GPIIb y GPIIIa	107
4.2.3.5. Análisis de pulso y caza para estudiar la síntesis de complejos [324K]GPIIb/IIIa en células CHO.....	110
4.2.3.6. Mutagénesis del residuo 324 de GPIIb	113
4.3. Fenotipo tromboasténico con expresión normal de GPIIb/IIIa (“variante”).....	115
4.4. Papel de la región carboxi-terminal de GPIIIa en la tasa de expresión y función del receptor de fibrinógeno	115
4.4.1. Estudio de la formación de complejos GPIIb/IIIa normales y mutantes	116
4.4.2. Análisis de la expresión superficial de las formas mutantes de GPIIIa mediante citometría de flujo.....	118
4.4.3. Análisis funcional del complejo GPIIb/IIIa-Δ(616-690).....	120
4.5. Regulación de la expresión en superficie del receptor de fibrinógeno	123
4.5.1. Relación entre disponibilidad de RNAm y expresión en superficie de GPIIb y GPIIIa en plaquetas	123
4.5.2. Expresión del receptor GPIIb/IIIa en la diferenciación megacariocítica de las células MEG-01	127
5. DISCUSIÓN	
5.1. Detección de mutaciones inéditas en el gen de GPIIb asociadas a tromboastenia de Glanzmann	132
5.2. Bases moleculares del fenotipo tromboasténico y criterios de clasificación	133
4.2.1. Clasificación por subtipos de la tromboastenia de Glanzmann	136
5.3. Análisis funcional de las mutaciones asociadas con fenotipo tromboasténico	138
5.3.1. Significado funcional de la mutación Cys ⁶⁷⁴ →Arg de GPIIb asociada a tromboastenia tipo II.....	138
5.3.1.1. Importancia de los puentes disulfuro en la formación y expresión superficial de complejos GPIIb/IIIa	138
5.3.2. Mutación [288delC] en el exón 2 de GPIIb.....	139
5.3.3. Mutación Arg ⁵⁹⁷ → STOP en el exón 19 de GPIIb	140
5.3.4. La mutación Glu ³²⁴ → Lys de GPIIb impide su asociación con GPIIIa.....	142

5.4. Importancia de la región carboxi-terminal de GPIIIa en la expresión y modulación de la afinidad del receptor de fibrinógeno	143
5.5. Etapas limitantes para la expresión superficial de GPIIb/IIIa.....	145
5.5.1. Contenido plaquetario de GPIIb/IIIa en portadores de mutaciones heterocigotas.....	145
5.5.2. Correlación entre niveles de RNAm y expresión superficial de GPIIb/IIIa	145
5.5.3. Efecto dominante negativo de mutaciones en GPIIb/IIIa.....	147
5.5.4. La interacción de la chaperona BiP con formas mutadas de GPIIb es responsable del efecto dominante negativo causado por [674R]GPIIb	148
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	155

ABREVIATURAS

aa: Aminoácido
ASPCR: Amplificación específica de alelos por PCR
BSA: Albúmina de suero bovino
cDNA: DNA complementario
CHO: Ovario de hámster chino
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: Ácido Desoxiribonucleico
dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
GP: Glucoproteína
h: Hora
KDa: Kilodaltons
min: Minutos
MoAb: Anticuerpo monoclonal
nt: Nucleótido
pb: Pares de bases
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF: Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro
PRP: Plasma rico en plaquetas
RNA: Ácido Ribonucleico
RNA_m: RNA mensajero
SD: Desviación standard
SDS: Dodecil sulfato sódico
seg: Segundos
SSCP: Polimorfismo conformacional de DNA monocatenario
TBS: Tampón Tris salino
TG: Tromboastenia de Glanzmann
U: Unidades
X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido

1- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN PLAQUETARIAS

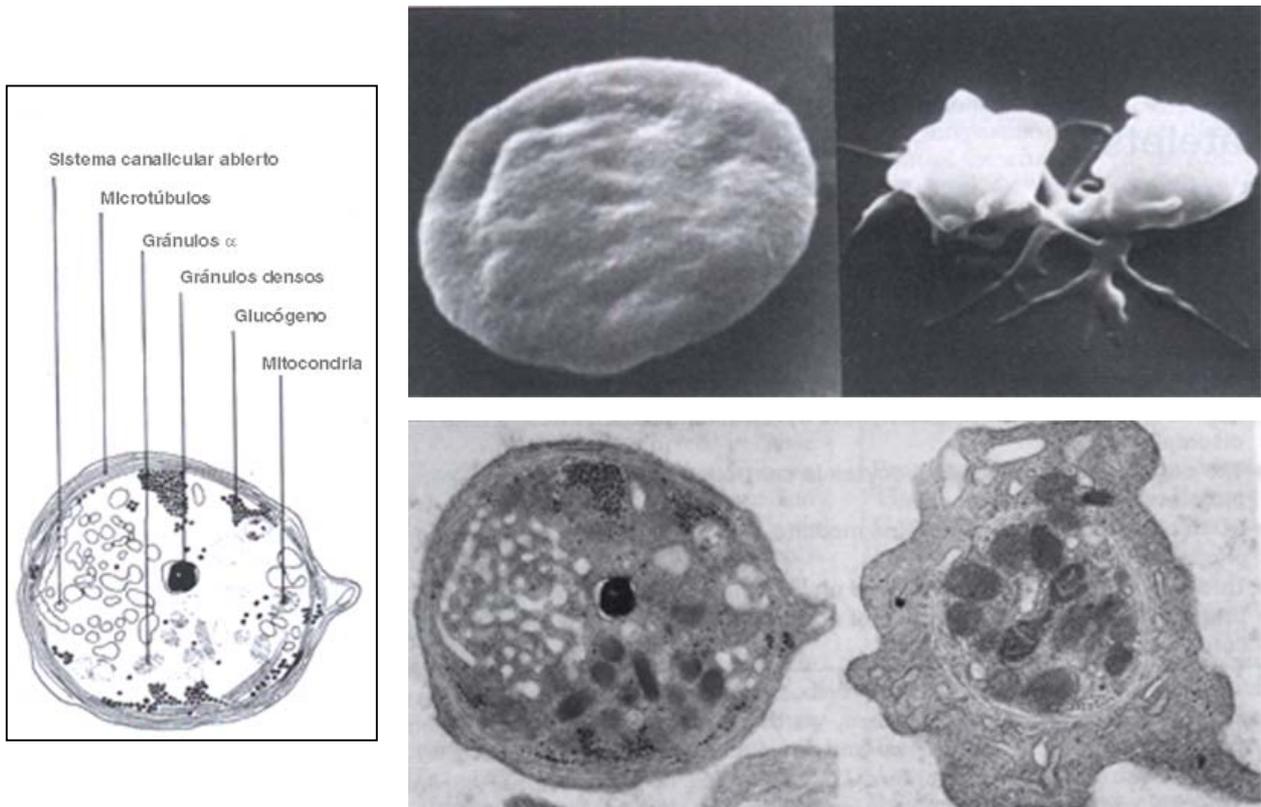
1.1.1. Morfología plaquetaria

Las plaquetas fueron identificadas, por primera vez, por Bizzozzero, en 1882, como elementos corpusculares de la sangre. Unos años más tarde, en 1888, Eberth y Schimmelbusch desvelaron la importancia de las plaquetas en la formación del tapón hemostático. Un hito importante en el conocimiento de la morfología y función plaquetarias fue el postulado de Aschoff (1925) de cómo la formación de fibrina y la subsiguiente formación de un trombo estaría precedida por cambios morfológicos de los elementos corpusculares sanguíneos. Las plaquetas son los corpúsculos más pequeños de la sangre (diámetro 2-4 μm) y, en condiciones fisiológicas, su número varía de 150.000 a 300.000/ mm^3 . Las plaquetas son corpúsculos anucleados que se forman en la médula ósea a partir de protuberancias de la membrana plasmática y del citoplasma de los megacariocitos. Su vida media en la circulación es de aproximadamente 10 días.

El desarrollo de los megacariocitos y la producción de plaquetas es un único proceso (Behnke y Forer, 1998). Durante la maduración megacariocítica se produce duplicación nuclear en ausencia de división celular, obteniéndose al final células de gran tamaño. Los orgánulos citoplasmáticos se organizan en dominios delimitados por una red de invaginaciones de la membrana plasmática que representan las futuras plaquetas nacientes. En la médula ósea los megacariocitos se localizan próximos a las paredes sinusoidales facilitando la salida al torrente sanguíneo de largos segmentos citoplasmáticos. La trombopoyetina es la hormona que controla el desarrollo megacariocítico (Kaushansky, 1995) al que también contribuyen otras citoquinas como las interleuquinas 3, 6 y 11. La trombopoyetina es el ligando del receptor de membrana de megacariocitos y plaquetas denominado c-mpl. Ratones genéticamente deficientes en c-mpl presentan disminución del número de plaquetas y megacariocitos y cantidades normales del resto de células hematopoyéticas (Gurney *et al*, 1994). Por tanto, la trombopoyetina parece ser el mayor, aunque no el único, regulador de la producción plaquetaria.

Figura 1

ESTRUCTURA DE LAS PLAQUETAS



Las fotografías superiores, obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, muestran la forma discoidea de las plaquetas en reposo (izquierda) y la forma esférica, con largos pseudópodos, de las plaquetas activadas (derecha). Las fotografías inferiores corresponden a secciones de plaquetas en reposo (izquierda) o activadas (derecha) obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión. En el panel de la izquierda se señalan los distintos orgánulos subcelulares que se observan en la fotografía anterior. (George, 2000)

Las plaquetas en reposo tienen forma discoidea y cambian a una forma globular con pseudópodos (hasta 5 μm de largo) cuando son activadas (Figura 1) (White, 1987). La membrana plasmática plaquetaria está formada por una típica bicapa lipídica en la cual se hallan encastradas diferentes glucoproteínas (GP), receptores para la activación e interacción con otras células. Además, la membrana plaquetaria posee receptores específicos de diversos agonistas (ADP, epinefrina y trombina, entre otros) acoplados a proteínas G (Brass *et al*, 1993). La unión del agonista genera la producción de segundos mensajeros que elevando los niveles de calcio citoplasmático (Rink y Sage, 1990), activan los sistemas enzimáticos y las vías de señalización que participan en la activación plaquetaria.

La actina (10-20%) y la miosina (15-20%) dan cuenta de la mayor parte de las proteínas plaquetarias y forman una trama citoplasmática tridimensional. Una segunda red bidimensional de fibras más cortas de actina forman un esqueleto submembranar que es responsable de la forma discoidea de la plaqueta en reposo. Los receptores de membrana están unidos a esta red a través de proteínas fijadoras de actina (ABP). Haces marginales de microtúbulos (microtúbulos de soporte o apoyo, MTS) contribuyen junto con el esqueleto de actina al mantenimiento de la forma discoidea de la plaqueta. En la periferia, cerca de los microtúbulos de soporte (MTS) se halla un sistema membranar denominado sistema tubular denso (STD), denominado así en base a su inherente opacidad electrónica. El STD sirve como depósito de calcio y araquidonato y es el lugar de síntesis del tromboxano, dado que es en donde se localiza el enzima ciclooxigenasa (COX). La proximidad al MTS sugiere que su origen es similar al del retículo sarcoplásmico del tejido muscular. En torno a la zona de los orgánulos intracelulares se halla un sistema membranar formado por invaginaciones de la membrana plaquetaria. Dado que este sistema está conectado con la superficie plaquetaria, es denominado sistema canalicular abierto (SCA) y su extroversión permite el aumento del cociente superficie/volumen durante la activación plaquetaria.

La distribución intracelular de orgánulos es casi uniforme en el citoplasma de plaquetas en reposo. Al igual que otros tipos celulares, el gasto energético de las plaquetas en reposo se obtiene del metabolismo oxidativo mitocondrial. Los gránulos de secreción son los orgánulos más abundantes (~40/plaqueta). Hay dos tipos de gránulos de secreción (Marcus *et al*, 1966): (a) gránulos densos que contienen

serotonina, ADP y calcio (McNicol e Israels, 1999); (b) gránulos α que contienen factor von Willebrand y factor-4 plaquetario, sintetizados por los megacariocitos, fibrinógeno procedente del plasma, adquirido por endocitosis mediada por receptor, y proteínas plasmáticas como albúmina, factor V o inmunoglobulinas, adquiridas por pinocitosis (Harrison y Cramer, 1993). Tras la activación plaquetaria, se libera el contenido granular contribuyendo así a diversas interacciones celulares.

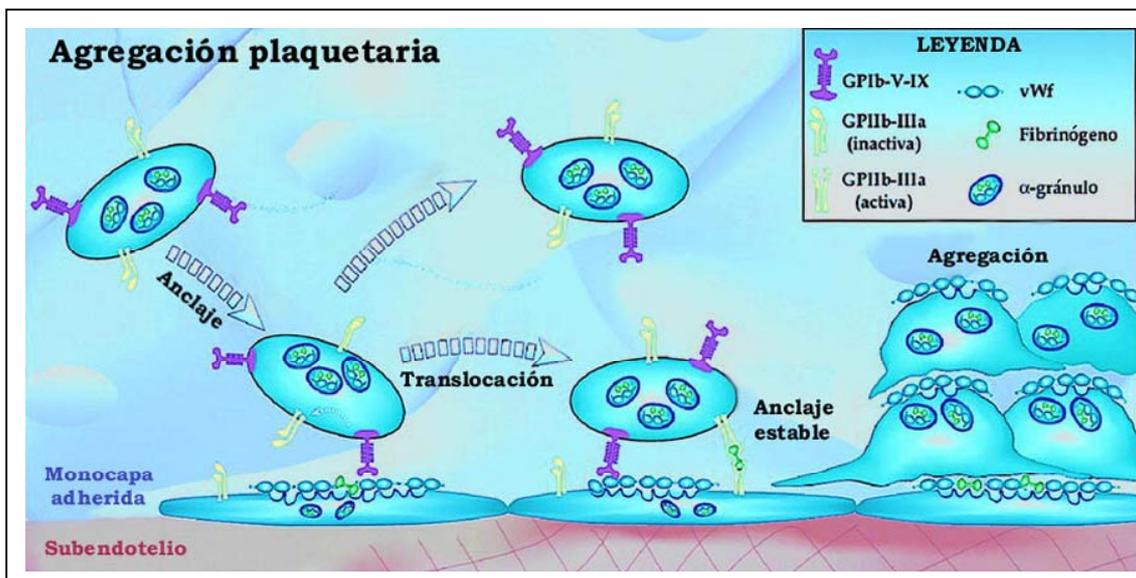
En los procesos hemostáticos o trombóticos las plaquetas se unen a distintos componentes de la pared vascular o interaccionan entre ellas o con otras células. Todos estos fenómenos están mediados por receptores de adhesión presentes en la superficie plaquetaria. Entre estos receptores están presentes integrinas, inmunoglobulinas, selectinas y proteínas ricas en leucina. Los más abundantes son glucoproteínas de la familia de las integrinas (Hynes, 1992; Berman y Kozlova, 2000) como $\alpha_{IIb}\beta_3$ (receptor de fibrinógeno), $\alpha_2\beta_1$ (receptor de colágeno), $\alpha_6\beta_1$ (receptor de laminina), $\alpha_5\beta_1$ (receptor de fibronectina) y $\alpha_v\beta_3$ (receptor de vitronectina). Entre las proteínas ricas en leucina que se expresan en plaquetas está el complejo GPIb-IX-V, cuyo ligando es el factor von Willebrand (Judson *et al*, 1982; Clemetson, 1997). Otros receptores de adhesión son la P-selectina (GMP-140; Johnston, 1989) que está localizada en los gránulos α y se incorpora a la membrana plasmática durante el proceso de secreción, y moléculas de adhesión celular como PECAM-1 (Albelda *et al*, 1991). A pesar del gran número y variedad de receptores de adhesión, las plaquetas circulan normalmente en suspensión. Esto se debe a que los receptores de las plaquetas circulantes se hallan en un estado de baja afinidad por sus ligandos y también a que los ligandos y activadores presentes en la matriz extracelular sólo son accesibles cuando se produce la ruptura de la pared vascular.

1.1.2. Fisiología plaquetaria: Hemostasia

Las plaquetas contribuyen al mantenimiento de la circulación preservando la integridad vascular y controlando la hemorragia tras una lesión de la pared vascular. Este proceso comprende una serie de acontecimientos regulados de forma coordinada que se definen como hemostasia (Sixma, 1977; Bick y Murano, 1994). Los mecanismos fundamentales implicados incluyen: adhesión, agregación, secreción y coagulación.

Figura 2

MODELO DE LOS MECANISMOS DE
AGREGACIÓN PLAQUETARIA



Tras una lesión vascular, las plaquetas se adhieren al subendotelio mediante la interacción de los complejos GPIb-IX con el factor von Willebrand. Este anclaje inicial de las plaquetas permite la activación plaquetaria y la liberación del contenido de los gránulos, desencadenando el fenómeno de agregación mediante interacciones plaqueta-plaqueta a través de los receptores de fibrinógeno. (Kulkarni *et al*, 2000)

Al producirse un daño en el endotelio vascular quedan expuestas las proteínas de la matriz subendotelial que promueven el contacto inicial y “*adhesión*” de las plaquetas a la zona lesionada. En este proceso intervienen múltiples sustratos (factor von Willebrand, colágeno, fibronectina, laminina, etc.) y receptores plaquetarios (GPIb-IX-V, integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$; Shattil y Bennett, 1981; Hynes, 1991). La interacción del factor von Willebrand con el complejo GPIb-IX sirve como un anclaje inicial de la plaqueta a la zona dañada y permite la interacción posterior del resto de receptores con sus ligandos (Houdijk y Sixma, 1985; Sakariassen *et al*, 1986; Ruggeri, 1995, 1997; Andrews *et al*, 1999). La rotura vascular provoca la activación plaquetaria mediante agonistas tales como colágeno, ADP o trombina, presentes en la matriz subendotelial. La activación plaquetaria provoca una reorganización del citoesqueleto que permite la extensión de la plaqueta sobre el endotelio.

Sobre esta capa adherente se produce la “*agregación*” mediante interacciones plaqueta-plaqueta que llevan a la formación de un tapón plaquetario que detiene la hemorragia (Figura 2) (De Vreker, 1965; Kulkarni *et al*, 2000). Estas interacciones se producen, fundamentalmente, por la unión del fibrinógeno a su principal receptor plaquetario, la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (heterodímero GPIIb/IIIa). La activación plaquetaria provoca un cambio conformacional en el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ que le permite adoptar un estado de alta afinidad por el fibrinógeno soluble y otras proteínas como fibronectina, vitronectina y factor von Willebrand. El mecanismo de activación del receptor de fibrinógeno ha sido objeto de especial atención por numerosos laboratorios en los últimos años; no obstante, se desconoce la base molecular de este proceso (Shattil, 1999). El fibrinógeno es el principal mediador de la agregación plaquetaria por ser el ligando que se une con mayor afinidad al receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ y por ser una de las proteínas más abundante del plasma (Peerschke *et al*, 1980). Además, el fibrinógeno es una proteína dimérica que permite la formación de puentes interplaquetarios responsables de la agregación (Herrick, 1999).

La activación debida a la unión de agonistas también promueve la “*secreción*” del contenido de los gránulos de las plaquetas. La secreción se desarrolla mediante la fusión de la membrana granular y la membrana plasmática, permitiendo así la liberación del contenido de los gránulos. En la activación de las plaquetas por agonistas como colágeno o trombina se produce ácido araquidónico que es rápidamente convertido en tromboxano A₂, principal estimulador de la secreción

plaquetaria. La secreción y la agregación plaquetaria son procesos íntimamente relacionados durante la hemostasia: la activación plaquetaria provoca la secreción del ADP, el cual estimula la agregación. La serotonina, liberada de los gránulos densos, además de actuar como vasoconstrictor es un agente agregante. El fibrinógeno que participa en la agregación se obtiene del plasma o es secretado por los gránulos α plaquetarios.

Las plaquetas también contribuyen en los procesos de la “coagulación” sanguínea. Las plaquetas activadas tienen una importante actividad procoagulante provocada, entre otras causas, por la presencia en su superficie de sitios de unión para proteínas de la cascada de coagulación o la liberación del factor V contenido en sus gránulos. Esto favorece la conversión de la protrombina en trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno produciendo la fibrina que lleva a la formación del coágulo sanguíneo. Finalmente, se produce la retracción del coágulo que favorece el cierre de la lesión. El coágulo es importante también en el inicio de la regeneración del tejido dañado. Así, la fibrina polimerizada actúa como matriz para el crecimiento de fibroblastos (Gray *et al*, 1990) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) promueve la multiplicación de células endoteliales y musculares ayudando a la reconstrucción de los vasos afectados.

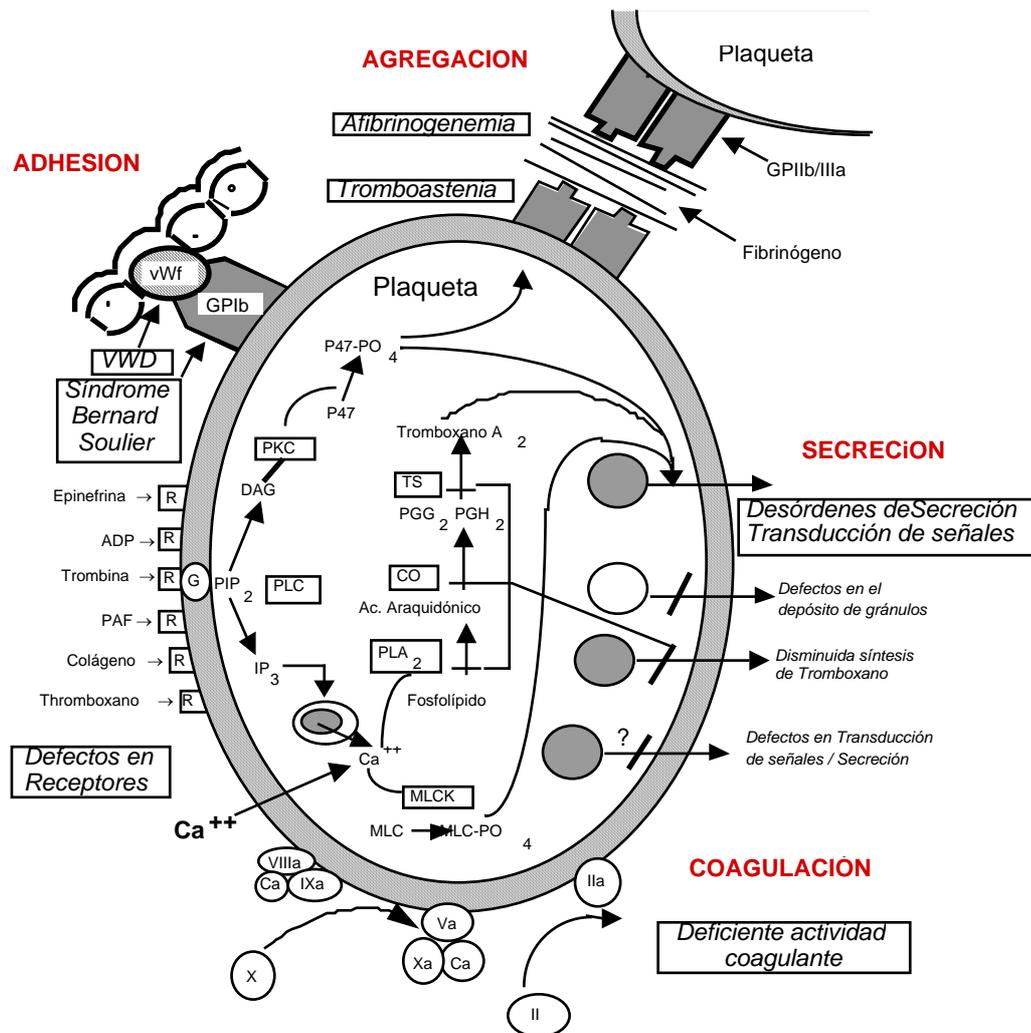
1.1.3. Alteraciones congénitas de la función plaquetaria

Los trastornos en la función plaquetaria se caracterizan por diversas manifestaciones hemorrágicas que pueden ser causadas por varios defectos congénitos. Estos se clasifican según la función o respuesta plaquetaria que está alterada en cada caso (Figura 3). En algunos pacientes está impedida la adhesión de las plaquetas al subendotelio. Dentro de este grupo encontramos la enfermedad de von Willebrand (Nichols y Ginsburg, 1997) causada por una deficiencia plasmática del factor von Willebrand (vWF) y el síndrome de Bernard-Soulier, cuyas plaquetas presentan anomalías en el receptor GPIb-IX (Berndt, 1989).

Otros casos se caracterizan por una disminución o falta de agregación plaquetaria causada por una deficiencia de fibrinógeno plasmático (afibrinogenemia; Al-Mondhiry, 1994) o de su receptor plaquetario GPIIb/IIIa (tromboastenia de Glanzmann; Coller *et al*, 1994). La unión del fibrinógeno es un requisito indispensable para la agregación, por ello las plaquetas de estos pacientes son

Figura 3

DEFECTOS CONGÉNITOS DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA



Representación esquemática de la fisiología plaquetaria normal y de los distintos trastornos congénitos agrupados según la función plaquetaria que se ve afectada. Abreviaciones: CO: cicloxigenasa; DAG: diacil-glicerol; IP₃: inositol trifosfato; MLC: cadena ligera de miosina; PAF: factor activador de plaquetas; PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato; PKC: proteína quinasa C; PLC: fosfolipasa C; PLA₂: fosfolipasa A₂; TS: tromboxano sintasa; vWf: factor von Willebrand; VWD: enfermedad de von Willebrand. (Rao, 1998)

incapaces de agregarse correctamente en respuesta a cualquiera de los agonistas fisiológicos.

El grupo de los pacientes con defectos en la secreción y transducción de señales es muy heterogéneo pero con una característica común, su incapacidad para liberar el contenido de los gránulos después de la activación plaquetaria por agonistas (Rao, 1998). Una pequeña parte de estos pacientes presentan un defecto en el depósito de gránulos densos. En otros casos, alteraciones en las vías de señalización impiden la secreción plaquetaria. También hay pacientes que presentan deficiencias en la ruta de síntesis del tromboxano A₂, importante regulador de la secreción.

Por último, existen pacientes cuya patología se debe a un defecto en la interacción de las plaquetas con las proteínas implicadas en la coagulación, como el síndrome Scott (Weiss, 1994), caracterizado por la falta de unión de los factores Va-Xa y VIIIa-IXa a las plaquetas, lo que impide la activación de la protrombina y la formación de fibrina.

1.2. INTEGRINAS

La adhesión celular regula los fenómenos de migración, proliferación y diferenciación celular que intervienen en gran número de procesos tales como el desarrollo embrionario, transformación tumoral, inflamación, hemostasia y reconocimiento inmune (Albelda y Buck, 1990). La adhesión celular está mediada por receptores de membrana que pertenecen a un limitado número de familias: integrinas (Hynes, 1992), cadherinas (Takeichi, 1991), selectinas (Lasky, 1992), inmunoglobulinas (Buck, 1992), moléculas relacionadas con CD44 (Kincade *et al*, 1993) y proteoglicanos transmembranarios (Bernfield *et al*, 1992).

Las integrinas son una familia de receptores heterodiméricos que median la adhesión celular uniéndose a proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, vitronectina, lamininas, osteonectina, trombospondina, factor von Willebrand, etc.), a proteínas plasmáticas (fibrinógeno, factor X de coagulación, etc.) y a otros receptores celulares (VCAM-1, ICAM-1, -2, -3, etc.).

1.2.1. Estructura de las integrinas

Las integrinas son heterodímeros formados por una subunidad α (120-180 KDa) y una subunidad β (90-110 KDa) asociadas de forma no covalente. Estas subunidades son productos de distintos genes, cuya transcripción debe estar coordinada para lograr el correcto procesamiento y expresión en superficie del heterodímero (O'Toole *et al*, 1989). La mayoría de las células expresan en su superficie distintas integrinas. En la Tabla I se muestran las integrinas conocidas hasta el momento, clasificadas según la subunidad β que poseen. Actualmente se han identificado 18 cadenas α y 8 cadenas β que heterodimerizan formando hasta 24 complejos distintos. Las integrinas que comparten la subunidad β_1 son la familia más numerosa, 12 cadenas α distintas se asocian con β_1 . Para mayor complejidad, existen algunas subunidades que pueden presentar procesamientos alternativos en los dominios citoplasmáticos, como es el caso de β_1 (Altruda *et al*, 1990), β_3 (van Kuppevelt *et al*, 1989), β_4 (Tamura *et al*, 1990), α_3 (Tamura *et al*, 1991) y α_6 (Horgervorst *et al*, 1991). En el caso de la subunidad α_{Ib} también se ha observado un procesamiento alternativo en el dominio extracelular próximo a la membrana (Bray *et al*, 1990).

Ambas subunidades α y β son glucoproteínas transmembranares con un único segmento hidrofóbico que atraviesa la membrana. Las integrinas poseen una estructura muy conservada con un largo dominio extracelular formado por aproximadamente 1000 residuos de la cadena α y 750 residuos de β . En general, las dos subunidades poseen una corta región citoplasmática C-terminal (Sastry y Horwitz, 1993; Williams *et al*, 1994), a excepción de la subunidad β_4 , cuyo dominio citoplasmático comprende más de 1000 residuos. Los dominios extracelulares de ambas subunidades se asocian para formar los heterodímeros. Ambas subunidades tienen múltiples puentes disulfuro (Calvete *et al*, 1989, 1991). Una característica de todas las subunidades β es la presencia de 4 repeticiones ricas en cisteínas que forman internamente puentes disulfuro (Calvete *et al*, 1991). La región N-terminal de esta subunidad forma un gran bucle por la presencia de un puente disulfuro intracatenario y este dominio participa en la unión del ligando. Todas las subunidades α contienen en su región extracelular 7 repeticiones de un segmento homólogo y las tres o cuatro últimas repeticiones contienen secuencias D-x-D-x-D-G-x-x-D o similares que generan sitios de unión de cationes divalentes. Los cationes divalentes son esenciales para la función de estos receptores. La naturaleza de los cationes afecta a la afinidad y

Tabla I
FAMILIAS DE INTEGRINAS Y SUS LIGANDOS

Subunidad β	Subunidad α	Ligandos	Secuencias de reconocimiento
β_1	α_1	Colágeno, laminina	GFOGER
	α_2	Colágeno, laminina, fibronectina	GFOGER, DGEA
	α_3	Fibronectina, laminina, colágeno, invasina, trombospondina, epiligrina	RGD
	α_4	Fibronectina, invasina, VCAM-1	péptido CS-1, CS-5 de fibronectina, IDAPS, QIDS
	α_5	Fibronectina, colágeno, fibrinógeno, invasina	RGD
	α_6	Laminina, invasina, fertilina	—
	α_7	Laminina	—
	α_8	Citotactina/tenascina-C, fibronectina	RGD
	α_9	Citotactina/tenascina-C	AEIDGIEL
	α_{10}	Colágeno	—
	α_{11}	Colágeno	—
β_2	α_V	Fibronectina, vitronectina	RGD
	α_L	ICAM-1, 2, 3, 4, 5	Péptido ICAM
	α_M	Factor X, fibrinógeno, iC3b, ICAM-1, factor inhibidor de neutrófilos	Péptidos P1 y P2 del fibrinógeno, péptido ICAM
	α_X	Fibrinógeno, iC3b	GPR
β_3	α_D	VCAM-1	—
	α_V	Colágeno, citotactina, fibronectina, fibrinógeno, proteína Tat del HIV, laminina, metaloproteinasa-2, osteopontina, protrombina, trombospondina, vitronectina, factor von Willebrand	RGD
β_4	α_{IIb}	Colágeno, fibronectina, fibrinógeno, plasminógeno, protrombina, trombospondina, vitronectina, factor von Willebrand	RGD HHLGGAKQAGDV
	α_6	Laminina	—
β_5	α_V	Fibronectina, proteína Tat del HIV, vitronectina	RGD
β_6	α_V	Fibronectina, citotactina/tenascina-C	RGD, DLXXL
β_7	α_4	Fibronectina, VCAM-1, MAdCAM-1	Péptido CS-1, LDT
	α_E	E-Cadherina	—
β_8	α_V	Fibronectina, laminina, colágeno	—

especificidad de los ligandos y son necesarios en muchos casos para la asociación de ambas subunidades (Kirchhofer *et al*, 1991). Esta región de la subunidad α participa también de manera importante en la unión del ligando.

Otra subdivisión de las integrinas puede hacerse en base a similitudes estructurales de las cadenas α . Algunas subunidades α sufren postraduccionalmente una escisión proteolítica que genera una cadena transmembrana más corta (25-30 KDa) unida por un puente disulfuro a una cadena pesada extracelular. Otras subunidades α contienen un segmento adicional de 200 aminoácidos conocido como dominio I, que es homólogo al sitio de unión del colágeno presente en el factor von Willebrand. El dominio I está presente en 9 integrinas (α_1 , α_2 , α_{10} , α_{11} , α_L , α_M , α_X , α_D y α_E ; Dickeson y Santoro, 1998). El análisis estructural de este dominio mediante cristalización en presencia de Mg^{2+} ha revelado que posee las características de un sitio de adhesión dependiente de ión metálico (MIDAS) y que es crucial para la unión del ligando. Las subunidades α con dominio I no sufren digestión proteolítica. En todas las subunidades β también se han identificado regiones altamente conservadas con una estructura de sitio MIDAS. Los dominios N-terminal de las subunidades α y β forman una estructura globular a la cual se unen los ligandos de cada integrina. Esta región se conecta a través de la membrana con los dominios citoplasmáticos que interactúan con proteínas del citoesqueleto y otros componentes intracelulares.

1.2.2. Función de las integrinas

Las integrinas conectan a las células con la matriz extracelular o con otras células (Hynes, 1992). Actúan como unión entre el citoesqueleto y los ligandos extracelulares, regulando procesos como la proliferación, la migración y la diferenciación celular (Adams y Watt, 1993; Schwartz *et al*, 1995; Sastry y Horwitz, 1996).

Las integrinas unen diversos ligandos que incluyen a componentes de la matriz extracelular (Ginsberg *et al*, 1983; Parise y Phillips, 1986), receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Marlin y Springer, 1987), componentes de microorganismos (Isberg y Leong, 1990; Relman *et al*, 1990) y ciertas proteínas plasmáticas (Bennett *et al*, 1979, 1982). En la mayoría de los casos, estas interacciones son dependientes de cationes divalentes y la secuencia del ligando reconocida por la integrina contiene un residuo ácido como componente principal. En

ciertos ligandos, el sitio reconocido es una corta secuencia peptídica lineal. Como se ha visto en la fibronectina, también hay regiones discontinuas de las proteínas que pueden estar involucradas en el reconocimiento del ligando. Cada integrina generalmente puede unirse a más de un ligando. Igualmente, cada ligando puede ser reconocido por más de una integrina.

1.2.2.1. Sitios de reconocimiento de ligandos

Se han definido distintos sitios de reconocimiento de ligandos en las integrinas. El primer sitio de unión estudiado fue la secuencia RGD (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984) presente en gran variedad de proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina, colágeno tipo I, factor von Willebrand, etc.) y reconocida por distintas integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ y muchas $\alpha_v\beta$). La integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$ también reconoce la secuencia HHLGGAKQAGDV del extremo C-terminal de la cadena γ del fibrinógeno, mientras que las integrinas leucocitarias $\alpha_X\beta_2$ y $\alpha_M\beta_2$ interaccionan con la secuencia N-terminal GPR de la cadena $A\alpha$ y fragmentos plasmáticos del fibrinógeno (Loike *et al*, 1991; Farrell y Thiagarajan, 1994). Algunas integrinas reconocen otras secuencias: por ejemplo, $\alpha_2\beta_1$ se une a las secuencias DGEA y GFOGER del colágeno tipo I (Mizuno *et al*, 2000; Xu *et al*, 2000); $\alpha_4\beta_1$ reconoce la secuencia IDAPS y la región variable EILDV (CS-1) de la fibronectina (Komoriya *et al*, 1991) además de la secuencia QIDS de VCAM-1 (Osborn *et al*, 1994); $\alpha_4\beta_7$ se une a los aminoácidos LDT de MAdCAM-1 (Fong *et al*, 1997). En el caso de la tenascina, la integrina $\alpha_v\beta_6$ reconoce la secuencia DLXXL (Kraft *et al*, 1999), mientras que $\alpha_9\beta_1$ se une al fragmento AEIDGIEL de esta misma proteína (Yokosaki *et al*, 1998). La existencia de múltiples sitios de reconocimiento en una misma proteína de adhesión permite la unión de distintas integrinas a una misma proteína a través de distintos sitios.

1.2.2.2. Sitios de unión de las integrinas

Distintas regiones de las subunidades α y β de las integrinas actúan conjuntamente para formar un dominio de unión del ligando. La localización exacta de los sitios no se conoce con certeza. El estudio de la amplia familia de las integrinas β_1 que compartiendo la misma subunidad β se unen a muy diversos ligandos, permite deducir que las subunidades α deben tener un papel más importante en la determinación de la

especificidad del ligando. Observaciones similares se han realizado en las integrinas β_2 y β_3 . La región MIDAS de la subunidad β de algunas integrinas podría funcionar como dominio de fijación de cationes y ligandos (Tozer *et al*, 1996). En las subunidades α se han localizado sitios potenciales de fijación mediante el mapeo de epítomos con anticuerpos monoclonales inhibidores y estudios de mutagénesis dirigida (Kamata *et al*, 1994; Mould *et al*, 1997). Distintos trabajos han implicado al dominio I de algunas cadenas α en funciones de unión de ligandos y cationes a las integrinas (Dickeson y Santoro, 1998). El dominio I de α_L está involucrado en el reconocimiento de ICAM-1; el dominio I de α_M está implicado en la unión de iC3b y el dominio I de α_2 es importante para la unión de colágeno y echovirus.

1.2.2.3. Señalización bidireccional de las integrinas

Las integrinas, además de funcionar como receptores de adhesión, juegan un papel importante en la señalización bidireccional con el medio extracelular (Hynes, 1992). La unión del ligando al dominio extracelular de la integrina provoca un dramático cambio conformacional que se propaga a través de la membrana plasmática hasta los dominios citoplasmáticos de las integrinas. Por tanto, la unión del ligando inicia un proceso de señalización centrípeta (“out-in”) que genera una cascada de sucesos como el agrupamiento de las integrinas (BurrIDGE *et al*, 1988), la fosforilación de proteínas intracelulares, cambios en el pH intracelular (Schwartz *et al*, 1991) y la regulación de la transcripción (Werb *et al*, 1989). La ocupación de los sitios del ligando conlleva la agrupación de las integrinas y la formación de estructuras conocidas como contactos focales donde el extremo carboxiterminal de las integrinas se une al citoesqueleto formando complejos oligoméricos con otras proteínas reguladoras (BurrIDGE *et al*, 1988). Estos ensamblajes proteicos tienen un importante papel en la modulación de la adhesión celular y en la inducción de los cambios morfológicos implicados en la extensión y locomoción celular. Los complejos de adhesión focal se observan mediante inmunofluorescencia como placas localizadas en la superficie celular conectadas con haces de filamentos de actina. Un diverso número de estructuras y proteínas como integrinas, proteínas del citoesqueleto, quinasas y moléculas de señalización celular están concentradas en estos sitios (Yamada y Miyamoto, 1995). En las adhesiones focales se han hallado proteínas como por ejemplo, la α -actinina, talina, tensina, paxilina, vinculina y tensina; proteínas quinasa como FAK (Focal

adhesion kinase), c-Src, PKC y ILK (Integrin-linked kinase). Un suceso temprano de la señalización a través de las integrinas es la fosforilación de la proteína quinasa FAK en respuesta a la adhesión celular (Parsons, 1996). La fosforilación de FAK inicia una cascada de fosforilaciones e interacciones con nuevas proteínas que se requieren para la señalización dependiente de adhesión. FAK está unida a varias rutas de señalización intracelular que no se conocen completamente. Estos complejos del citoesqueleto dependientes de integrinas también están involucrados en la activación de la ruta de las MAP-quinasas. La ruta de las MAP-quinasas se activa en respuesta a factores de crecimiento o a uniones integrina-ligando. Las MAP-quinasas activan a su vez variedad de factores de transcripción como SRF o cMyc involucrados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular.

Señales de origen intracelular pueden modificar la afinidad de los receptores por su ligando. A este tipo de señalización se le denomina celulífuga (“in-out”). Un ejemplo típico es la activación plaquetaria por agonistas de receptores de superficie. Las señales intracelulares generadas por estos receptores, por mecanismos aún sin dilucidar, dan lugar a un cambio conformacional del receptor GPIIb/IIIa y al aumento de su afinidad por fibrinógeno. Las integrinas normalmente están en un estado de baja afinidad y no se unen a su ligando sin un proceso previo de activación. Integrinas de las familias β_1 , β_2 , y β_3 han mostrado necesitar activación para unirse a sus ligandos (Williams et al, 1994). La señalización celulífuga (in-out) estaría mediada por dominios citoplasmáticos de la integrina en respuesta a fenómenos de señalización intracelular (O’Toole et al, 1994). Se ha postulado que la interacción de los extremos carboxiterminales intracelulares de las subunidades α y β con proteínas intracelulares sería responsable de cambios conformacionales que se propagarían dando lugar a un aumento de afinidad por el ligando. Trabajos recientes han implicado a proteínas intracelulares como calreticulina, serina-treonina quinasas y miembros de la familia de GTPasas como R-Ras y RhoA (Hotchin y Hall, 1996). La modulación de la afinidad o activación de las integrinas es un fenómeno muy estudiado en la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) plaquetaria (Faull y Ginsberg, 1995). La activación de $\alpha_{IIb}\beta_3$ es iniciada por la ocupación de receptores de agonistas por sus ligandos promoviendo las rutas clásicas de transducción de señales: proteínas G y tirosina quinasas que promueven la activación de fosfolipasa C, cambios del calcio citosólico y activación de proteínas quinasas celulares como PKC. La activación de integrinas es también

esencial en el tránsito de los leucocitos desde la sangre a los tejidos. La activación de las integrinas β_2 leucocitarias también conlleva modulación de la afinidad por el ligando, aunque hay otros mecanismos implicados (Kucik *et al*, 1996). Finalmente, los complejos mecanismos de activación e inactivación de integrinas β_1 dirigen la adhesión transitoria que caracteriza la migración de las células epiteliales y mesenquimales.

1.2.3. Regulación de las integrinas

Los mecanismos que regulan la función de las integrinas son diversos pero se pueden dividir en cuatro categorías generales:

1.2.3.1. Regulación de los niveles de expresión de las integrinas

Un mecanismo para el control de los procesos de adhesión es la regulación de la expresión de las integrinas. Los mecanismos transcripcionales y traduccionales que intervienen en la regulación de la expresión de las integrinas no están bien definidos. Alteraciones en la expresión de las integrinas de diferentes células pueden controlarse mediante factores de crecimiento y diferenciación celular. El factor de necrosis tumoral β , el interferón γ y el ácido retinoico controlan la expresión superficial de gran variedad de integrinas (Heino *et al*, 1989; Igotz *et al*, 1989; Defilippi *et al*, 1991). Los cambios de expresión de las integrinas en respuesta a estos factores ocurre transcurridas 12-72 horas y es el resultado de alteraciones específicas en la síntesis de alguna subunidad. Sin embargo, alteraciones rápidas de los niveles de expresión superficial de las integrinas pueden tener lugar por movilización de depósitos intracelulares de integrinas en respuesta a estímulos externos o a factores quimiotácticos. Este es el caso de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente en los gránulos α plaquetarios (Niiya *et al*, 1987) o las integrinas β_2 depositadas en los gránulos de monocitos o neutrófilos (Bainton *et al*, 1987).

1.2.3.2 Regulación de la función de integrinas por cationes divalentes

La unión del ligando y la asociación de las subunidades de algunas integrinas es dependiente de la presencia de cationes divalentes. El tipo y concentración de cationes presentes en el ambiente afectan la afinidad por el ligando (Kirchhofer *et al*, 1991). Muchas integrinas pueden reconocer más de un ligando y los cationes divalentes

pueden influir en la especificidad para este ligando. Aunque los cationes divalentes son esenciales para la función de las integrinas, su mecanismo de acción no está totalmente aclarado y han sido propuestos dos modelos para explicarlo. En un modelo, los cationes divalentes unen *directamente* los ligandos a las integrinas. Evidencias de esta hipótesis provienen de la cristalografía del dominio I presente en muchas subunidades α (Lee *et al*, 1995). Mediante la coordinación de un ión magnesio, una secuencia MIDAS (DxSxS) del dominio I de α_M permite la unión al residuo ácido del ligando. No todas las subunidades α contienen dominios I, pero los sitios MIDAS están presentes en todas las subunidades β y median su unión al ligando. Por ello, la unión de integrinas y ligandos a través de cationes divalentes podría ser un mecanismo de acción general. En β_3 , la formación de un complejo ternario entre integrina, catión y ligando sólo participa en la interacción inicial integrina-ligando, pero después de la unión del ligando, el catión es eventualmente desplazado del complejo (D'Souza *et al*, 1994). De acuerdo a este segundo modelo, los cationes divalentes actuarían *indirectamente* alterando la conformación del sitio de unión del ligando. Un catión estimulador (Mn^{2+}) puede, por él mismo, inducir la misma conformación que normalmente se induce por la unión del ligando, sugiriendo que los cationes regulan un equilibrio conformacional entre las integrinas activas o en reposo. Queda por aclarar si el efecto conformacional de los cationes divalentes es alterar directamente el sitio de unión al ligando o, alternativamente, promover una reorganización general de la estructura de la integrina. En contraste con el dominio I, los sitios de unión de cationes divalentes de las cadenas α parecen no contactar con el ligando (Springer, 1997) y regulan la adhesión por un mecanismo que no produce efectos en la unión del ligando (Pujades *et al*, 1997).

1.2.3.3. Regulación de las integrinas por la especificidad celular

La especificidad por el ligando de una integrina puede estar controlada por modulaciones específicas del tipo celular donde se encuentre. Esto ocurre, por ejemplo, con la integrina $\alpha_2\beta_1$, la cual actúa como receptor de colágeno en las plaquetas pero como receptor de laminina y colágeno en células endoteliales (Kirchhofer *et al*, 1990). Este receptor es inmunológicamente indistinguible en ambos tipos celulares y no parece sufrir procesamientos alternativos. Por ello, la función de esta integrina parece estar modulada por la asociación de proteínas específicas de

cada tipo celular o por factores lipídicos. Las integrinas son proteínas transmembranares, por ello el ambiente lipídico puede afectar la conformación de las subunidades y sus propiedades de señalización. Existen ejemplos de lípidos que regulan o alteran la función de integrinas (Hermanowski *et al*, 1992). De este modo, se ha visto que la afinidad y conformación de $\alpha_v\beta_3$ puede ser modulada por el entorno fosfolipídico del receptor.

1.2.3.4. Regulación de las integrinas por modulación de la afinidad

Los mecanismos anteriores requieren cierto tiempo para producir un efecto, por tanto, no pueden ser responsables de la rápida expresión de sitios de unión al ligando observada en respuesta a ciertos agonistas. Los agonistas fisiológicos inducen la adhesión celular modulando la afinidad de la integrina por el ligando.

Los cortos dominios citoplasmáticos de las subunidades α y β juegan un papel crucial en la regulación de la afinidad de la integrina por el ligando. Por ejemplo, deleciones o mutaciones puntuales en zonas citoplasmáticas próximas a la membrana pueden alterar una importante región de bisagra, provocando que la integrina adopte constitutivamente un estado de alta afinidad por el ligando (Hughes *et al*, 1996). Mutaciones en residuos clave de las colas citoplasmáticas de β_3 y β_1 (O'Toole *et al*, 1995) e intercambios de los dominios citoplasmáticos de las cadenas α , alteran el estado de afinidad de las integrinas (O'Toole *et al*, 1994). Dos regiones clave han sido identificadas en los dominios citoplasmáticos de las integrinas: el primero es el sitio NPXY altamente conservado en los dominios citoplasmáticos de la mayoría de subunidades β . Mutaciones puntuales de este sitio en β_3 y β_1 anulan la activación de la integrina (Hughes *et al*, 1996). La segunda región es la secuencia conservada KLLxxxxD próxima a la membrana. Deleciones que comprenden esta región en integrinas β_3 provocan una activación constitutiva. Adicionalmente, la eliminación de otra región conservada (KXGFFKR), próxima a la membrana del dominio citoplasmático de α_{IIb} , también provoca la activación constitutiva de la integrina (Williams *et al*, 1994). Los residuos terminales de los dominios citoplasmáticos de α y β pueden estar formando un puente salino que estabiliza una conformación inactiva. Esto se demostró realizando mutaciones puntuales en estos sitios y viendo que provocaban la activación de la integrina (Hughes *et al*, 1996).

Estos resultados sugieren que interacciones del dominio citoplasmático de las integrinas con proteínas intracelulares, inducen cambios conformacionales a través de la membrana que provocan la alteración de la afinidad de la integrina. La calreticulina, proteína de unión del calcio, interacciona con la secuencia KXGFFKR del dominio citoplasmático de las subunidades α . Los complejos $\alpha_2\beta_1$ -calreticulina son sólo detectados durante la activación de la integrina, sugiriendo un posible papel de esta proteína en la modulación de la afinidad (Coppolino *et al*, 1995). Algunos estudios demuestran la posible fosforilación del dominio citoplasmático de ciertas integrinas. En el caso de GPIIb/IIIa, la subunidad β_3 es fosforilada en residuos de serina o treonina durante la activación plaquetaria (Parise *et al*, 1990) y la fosforilación de estos sitios parece regular la exposición de sitios inducidos por unión del ligando (LIBS) (van Willigen *et al*, 1996). Otros elementos intracelulares que se unen a las regiones citoplasmáticas de las integrinas son proteínas tan abundantes como talina y α -actinina. La β_3 -endonexina es una nueva proteína intracelular que no presenta homología con ninguna otra conocida hasta el momento (Shattil *et al*, 1995). Los aminoácidos NIKY de las posiciones 756-759 de la subunidad β_3 son críticos para la unión de la β_3 -endonexina a las colas citoplasmáticas de GPIIb/IIIa (Eigenthaler *et al*, 1997). En células transfectadas, la unión de la β_3 -endonexina induce la activación de GPIIb/IIIa. Recientemente, se ha encontrado una proteína de unión de calcio CIB asociada a la región citoplasmática de α_{IIb} en las plaquetas. Esta proteína presenta una alta homología con la calmodulina, pudiendo ser una molécula reguladora de esta integrina (Naik *et al*, 1997). Igualmente, la quinasa ligada a integrinas p59ILK es una serina-treonina quinasa que interacciona con la cola citoplasmática de β_1 (Hannigan *et al*, 1996).

Asociaciones de integrinas con otras proteínas de membrana también pueden modular la afinidad de la integrina, sin ser necesariamente a través de los dominios citoplasmáticos. De este modo, las integrinas β_3 pueden asociarse con proteínas como CD47 o IAP (integrin-associated protein). Se ha demostrado recientemente que la unión de IAP a su ligando (trombospondina) activa a la integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Chung *et al*, 1997). Miembros de la superfamilia transmembranar-4, proteínas TM4SF como CD9, CD81, NAG2 o CD63 se han encontrado asociadas a distintas integrinas aunque todavía no se sabe si esta interacción podría regular la afinidad de las integrinas.

Agentes no fisiológicos como anticuerpos monoclonales activadores o péptidos ligando-miméticos también estimulan la adhesión celular a ligandos inmovilizados en casi todas las integrinas estudiadas. Estos activadores no fisiológicos efectúan cambios conformacionales en las integrinas induciendo la unión de los ligandos con alta afinidad, pero sin requerir de la transducción de señales (Du *et al*, 1991).

1.3. INTEGRINA PLAQUETARIA $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)

La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ fue identificada primero como una glucoproteína plaquetaria denominada GPIIb/IIIa, ausente en casos de tromboastenia de Glanzmann (Nurden y Caen, 1976; Jennings y Phillips, 1982). Las plaquetas poseen alrededor de 80.000 copias del complejo GPIIb/IIIa, lo que constituye un 2-3% del total de las proteínas plaquetarias (Wagner *et al*, 1996). Esta glucoproteína se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática aunque también se encuentra almacenada en las membranas del sistema canalicular y los gránulos α de las plaquetas.

1.3.1. Estructura de los genes de GPIIb y GPIIIa

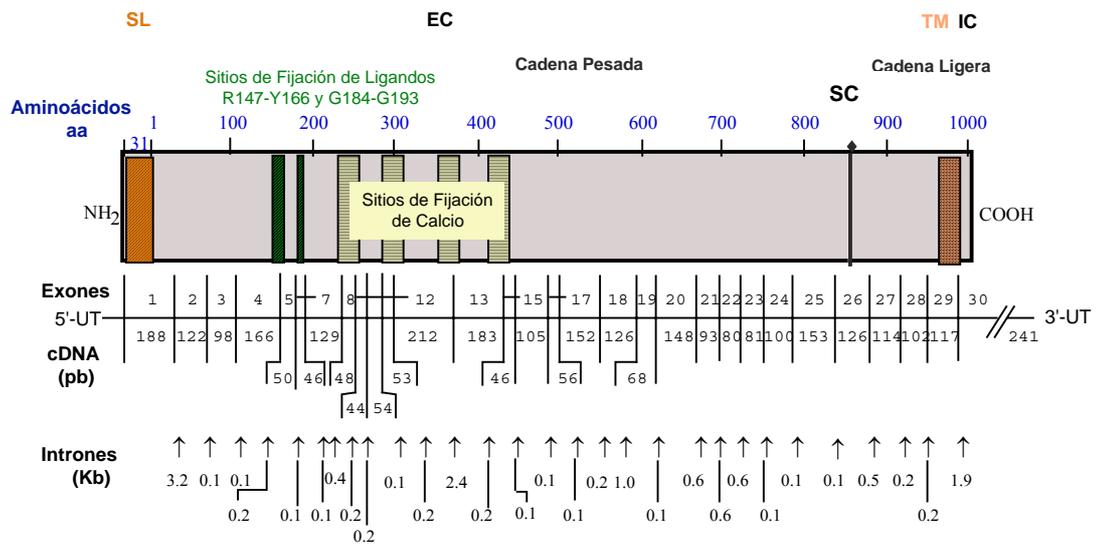
Las glucoproteínas GPIIb y GPIIIa están codificadas por genes distintos de copia única, localizados ambos en la región q21.32 del cromosoma 17, a una distancia de 1,3 centiMorgans y orientados en la misma dirección (Thornton *et al*, 1999).

El gen GPIIb comprende 17,2 Kb y posee 30 exones cuyos tamaños oscilan entre 45 y 249 pb e intrones entre los 77 y 2800 pb (Heidenreich *et al*, 1990). El péptido señal y parte del extremo N-terminal de la proteína madura están contenidos en el primer exón, el sitio de corte entre la cadena pesada y ligera en el exón 26, la región de transmembrana en el exón 29, el dominio citoplasmático en el exón 30 y las secuencias de los cuatro dominios de unión de calcio están distribuidas en los exones del 9 al 15 (Figura 4).

El gen GPIIIa tiene 63 Kb y está dividido en 15 exones con tamaños que oscilan entre 79 y 425 pb, salvo el último exón de 3618 pb que sólo contiene 63 nucleótidos del dominio intracelular y el resto corresponde a la región 3' no codificadora (Lanza *et al*, 1990; Zimrin *et al*, 1990; Wilhide *et al*, 1997). Los 26 primeros residuos aminoacídicos pertenecen al péptido señal (Fitzgerald *et al*, 1987). La organización de los exones no se corresponde exactamente con los dominios funcionales de la

Figura 4

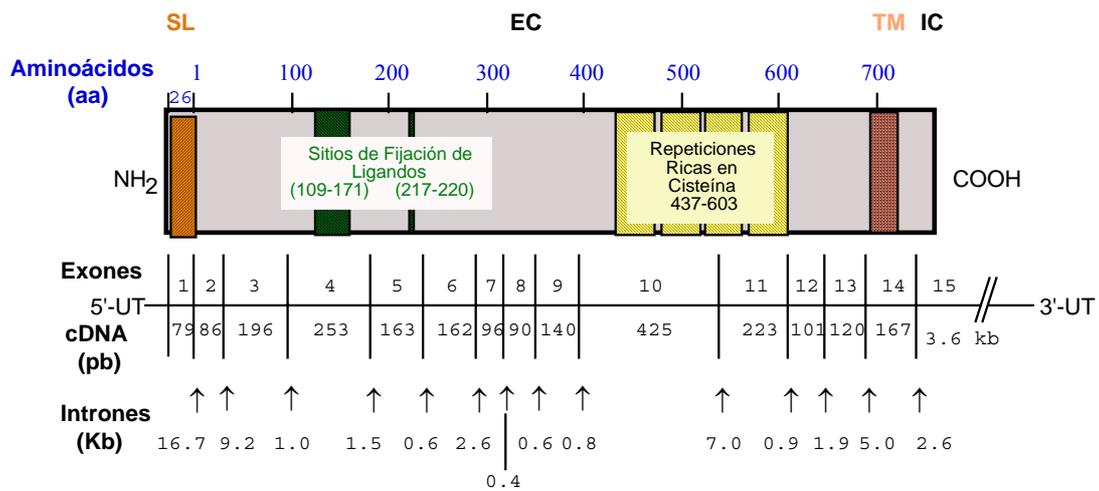
ORGANIZACIÓN DEL GEN DE LA GLUCOPROTEÍNA IIb HUMANA



En la zona superior del gráfico se representa esquemáticamente la proteína GPIIb, numerando los aminoácidos a partir del extremo amino de la proteína madura e indicando las regiones de la secuencia líder (SL), sitios de fijación de los ligandos y el calcio, sitio de corte (SC) entre las cadenas pesada y ligera, dominio extracelular (EC), de transmembrana (TM) y citosólico (IC). En la parte inferior se indica la distribución y tamaño de los exones e intrones del gen de GPIIb humano.

Figura 5

ORGANIZACIÓN DEL GEN DE LA GLUCOPROTEÍNA IIIa HUMANA



En la zona superior del gráfico se representa esquemáticamente la proteína GPIIIa, numerando los aminoácidos a partir del extremo amino de la proteína madura e indicando las regiones de la secuencia líder (SL), sitios de fijación de los ligandos, repeticiones ricas en cisteínas, dominio extracelular (EC), de transmembrana (TM) y citosólico (IC). En la parte inferior se indica la distribución y tamaño de los exones e intrones del gen de GPIIIa humano.

proteína. El dominio transmembranar está codificado en un sólo exón, sin embargo, otros dominios como las repeticiones ricas en cisteína están interrumpidos por intrones (Figura 5).

Se han descrito procesamientos alternativos de RNAs mensajeros de GPIIb y GPIIIa. En el caso de GPIIb, la forma alternativa presenta una delección de 102 pb en el exón 28 que codifica 34 aminoácidos del dominio extracelular de GPIIbL (Bray *et al*, 1990). Esta delección parece interferir en la biosíntesis y expresión de la integrina (Kolodziej *et al*, 1991). De la subunidad GPIIIa también se han identificado otras dos formas, una aislada en placenta y otra en osteoclastos, que presentan en ambos casos variaciones en el extremo carboxilo de los dominios citoplasmáticos (van Kuppevelt *et al*, 1989; Kumar *et al*, 1997). Se desconoce si estos transcritos alternativos desempeñan algún papel fisiológico.

Los patrones de expresión de las glucoproteínas Iib y IIIa difieren en distintos tejidos: GPIIb sólo forma heterodímeros con GPIIIa y su expresión es exclusiva de plaquetas y megacariocitos, mientras GPIIIa también forma parte de la integrina $\alpha_v\beta_3$ que está ampliamente distribuida en distintos tipos celulares. Esto sugiere que la transcripción de estos genes debe estar controlada por distintos factores específicos, aunque se desconocen los mecanismos de control. Al igual que otras integrinas, las regiones promotoras de ambos genes carecen de caja TATA y CAAT (Uzan *et al*, 1991; Villa-García *et al*, 1994). En la región promotora del gen GPIIb se han definido 2 sitios GATA (-454; -54) y 2 sitios Ets (-510; -35) cruciales para la regulación de la transcripción y la especificidad celular de este gen (Block y Poncz, 1995). También se ha descrito un sitio Sp1 como posible responsable de la inhibición de la expresión de GPIIb en células no megacariocíticas (Shou *et al*, 1998).

1.3.2. Estructura de las glucoproteínas GPIIb y GPIIIa

Al igual que el resto de integrinas, el complejo GPIIb/IIIa, o integrina $\alpha_{Iib}\beta_3$, es un heterodímero no covalente, dependiente de calcio (Fitzgerald y Phillips, 1985), formado por la glucoproteína Iib (GPIIb) o subunidad α_{Iib} y por la glucoproteína IIIa (GPIIIa) o subunidad β_3 .

La subunidad GPIIb está formada por una cadena pesada (~125 KDa) y una cadena ligera (~22 KDa) unidas a través de un puente disulfuro entre los residuos C826-C880 (Poncz *et al*, 1987). Posee un total de 18 residuos de cisteína altamente conservados

que dan lugar a 9 puentes disulfuro distribuidos a lo largo de toda la proteína. La cadena liviana (GPIIbL) presenta un dominio de transmembrana de 26 aminoácidos y una pequeña cola intracelular. En el extremo aminoterminal de la cadena pesada (GPIIbH) se localizan cuatro importantes sitios de fijación de calcio (Figura 6).

La subunidad GPIIIa (~95 KDa), formada por 762 aminoácidos, es un polipéptido de cadena sencilla con un único segmento transmembranar de 29 residuos y un corto dominio citosólico (Fitzgerald *et al*, 1987). El dominio extracelular de 692 aminoácidos contiene 56 cisteínas agrupadas en 5 regiones, una única en el extremo aminoterminal y 4 repeticiones ricas en cisteína de unos 40 residuos cada una localizadas próximas a la membrana. Los residuos de cisteína de GPIIIa forman numerosos puentes disulfuro intracatenarios entre los cuales destacan dos largos puentes formados entre los residuos C5-C435 y C406-C655 (Figura 6).

El mapeo de GPIIb/IIIa mediante proteólisis limitada ha permitido desvelar las zonas intra e intermoleculares conectadas en el heterodímero (Figura 7). De esta manera, las regiones de GPIIIa que incluyen los residuos 217-298 y 324-366, junto a regiones de la mitad carboxiterminal de GPIIbH (486-553; 696-734; 780-817) y de la zona próxima a la membrana de GPIIbL (30-75), forman la superficie de contacto entre ambas subunidades del complejo. Del mismo modo, los extremos amino y carboxilo de GPIIbH se encuentran localizados muy próximos (Calvete, 1995).

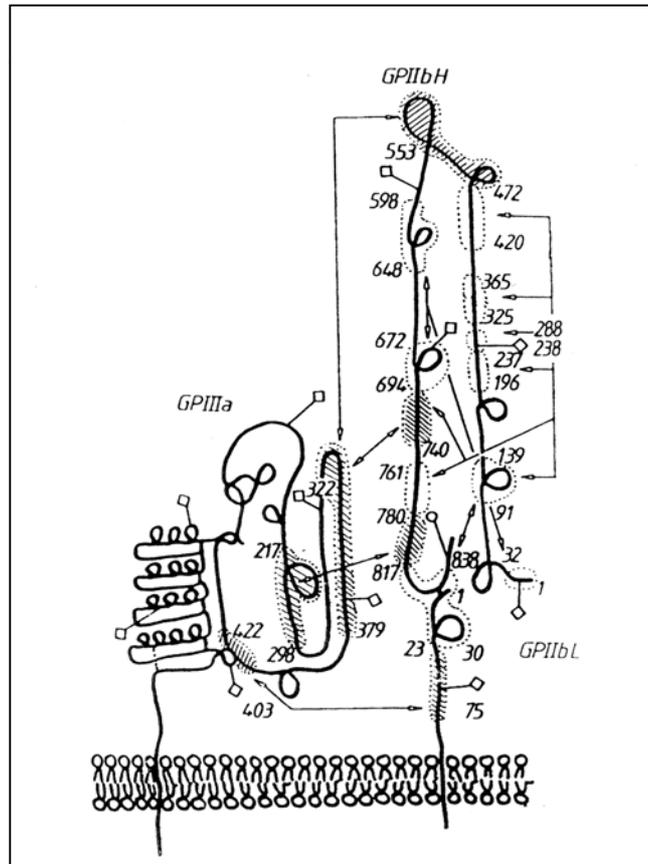
Tanto GPIIb como GPIIIa son proteínas polimórficas, siendo responsables de un elevado número de aloantígenos plaquetarios muy relevantes. Estos polimorfismos son causantes de síndromes inmunológicos como la púrpura postransfusión o la trombocitopenia neonatal. Algunos de estos polimorfismos también se han considerado posibles factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Bray, 2000).

1.3.3. Biosíntesis de GPIIb/IIIa

La expresión superficial del complejo GPIIb/IIIa se realiza a través de una ruta de biosíntesis característica de las integrinas. La glucoproteína GPIIb se sintetiza primero como una cadena precursora sencilla denominada proGPIIb. Los polipéptidos precursores de proGPIIb y GPIIIa sufren una glucosilación inicial en el retículo endoplásmico, lugar donde se produce la asociación de ambas subunidades. El ensamblaje de proGPIIb y GPIIIa requiere previamente un adecuado plegamiento de

Figura 7

MODELO ESTRUCTURAL DE LAS ZONAS DE CONTACTO DE GPIIb/IIIa



Representación gráfica de las regiones involucradas en interacciones intra (zonas discontinuas) e intermoleculares (zonas sombreadas) de los complejos GPIIb/IIIa no activados. Las flechas conectan los dominios asociados y los sitios de N- y O-glicosilación se representan como --□ y como --O, respectivamente. (Calvete, 1995)

ambas subunidades. En este correcto plegamiento intervienen principalmente las proteínas chaperonas del retículo que se unen a las distintas subunidades de las proteínas oligoméricas hasta que adoptan la conformación adecuada para el ensamblaje del complejo. Una vez formado el heterodímero ProGPIIb/IIIa, éste se transporta rápidamente al aparato de Golgi, donde se finaliza el procesamiento de las cadenas complejas de carbohidratos de proGPIIb y se produce la ruptura proteolítica que da lugar a la subunidad GPIIb madura, formada por una cadena pesada y otra ligera unidas por un puente disulfuro. Finalmente, el complejo maduro GPIIb/IIIa es transportado hasta la membrana de la superficie celular (Duperray *et al*, 1989; O'Toole *et al*, 1989).

1.3.4. Función de GPIIb/IIIa

En plaquetas activadas, el complejo GPIIb/IIIa funciona principalmente como receptor de fibrinógeno aunque también reconoce proteínas como el factor von Willebrand, la vitronectina y la fibronectina entre otras. Su unión a fibrinógeno es indispensable para la agregación plaquetaria y su interacción con otras proteínas contribuye a la adhesión de las plaquetas al subendotelio.

Muchos estudios han tratado de caracterizar las interacciones moleculares de GPIIb/IIIa con sus ligandos. Este receptor reconoce dos cortas secuencias lineales en sus ligandos: el péptido RGD presente en gran número de proteínas de adhesión y el dodecapéptido HHLGGAKQAGDV (H12) del fibrinógeno. El fibrinógeno es una glucoproteína soluble de 340 KDa formada por tres pares de cadenas distintas denominadas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ . El fibrinógeno posee tres posibles sitios de unión al complejo GPIIb/IIIa: dos secuencias RGD localizadas en los residuos 95-97 y 572-574 de la cadena $\text{A}\alpha$ y una secuencia de 12 residuos (aa 400-411) localizada en el extremo carboxilo de la cadena γ (Kloczewiak *et al*, 1982). Estudios con moléculas de fibrinógeno genéticamente modificadas mostraron que las secuencias RGD no son necesarias para la unión de fibrinógeno soluble a GPIIb/IIIa o para la agregación plaquetaria. Sin embargo, el dodecapéptido de la cadena γ , específicamente los residuos AGDV, son indispensables para la unión del fibrinógeno durante el proceso de agregación (Farrell *et al*, 1992). Los sitios RGD de las cadenas $\text{A}\alpha$ poseen mayor importancia cuando el fibrinógeno está inmovilizado sobre una superficie o en forma de fibrina (Savage *et al*, 1995).

Algunos de los dominios de GPIIb/IIIa implicados en la unión de fibrinógeno han sido localizados mediante distintos estudios. La región de GPIIIa D109-E171 está implicada, muy probablemente, en el reconocimiento del ligando (D'Souza *et al*, 1988). Mutaciones puntuales o anticuerpos que reconocen esta región inhiben la unión del ligando (Loftus *et al*, 1990; Calvete *et al*, 1991). Esta zona de GPIIIa está muy conservada en las distintas integrinas, sugiriendo que puede ser un sitio de contacto con el ligando común en todas las integrinas. Otra región importante de GPIIIa es la secuencia D217-E220. Mediante anticuerpos o péptidos sintéticos de esta región se puede impedir también la unión del fibrinógeno a GPIIb/IIIa (Charo *et al*, 1991). En la subunidad GPIIb también se han identificado distintas zonas de la región aminoterminal involucradas en la fijación del ligando como es el caso de las secuencias R147-Y166 (Honda *et al*, 1998), G184-G193 (Kamata *et al*, 1996) y A294-M314 (D'Souza *et al*, 1990). Finalmente, el dodecapéptido de la cadena γ (H12) del fibrinógeno y la secuencia RGD parecen unirse a distintos sitios del complejo GPIIb/IIIa (Hu *et al*, 1999). Así, un fragmento recombinante de β_3 (274-368) que une la región carboxiterminal de la cadena γ del fibrinógeno, no es capaz de unir el péptido RGD (Alemany *et al*, 1996).

En la plaqueta en reposo, la integrina GPIIb/IIIa posee una conformación con baja afinidad que le permite unir pequeños péptidos RGD o ligandos inmovilizados, pero no es capaz de fijar proteínas plasmáticas en solución e iniciar procesos de agregación. Tras la activación plaquetaria desencadenada por agonistas como ADP o trombina, el receptor adopta una configuración que le facilita fijar ligandos solubles con alta afinidad. Se desconoce qué cambios estructurales en GPIIb/IIIa son responsables de los cambios de afinidad por el ligando. Sin embargo, observaciones recientes han permitido proponer un modelo, según el cual, en plaquetas en reposo una región tipo MIDAS de la subunidad GPIIIa estaría tapando el sitio de fijación de ligando en la subunidad GPIIb. Tras la activación plaquetaria se produciría un cambio conformacional en el dominio de GPIIIa que le permitiría, por una parte, exponer su sitio de fijación y, por otra, cambiar su orientación para dejar expuesto el sitio de fijación en la subunidad GPIIb (Loftus y Liddington, 1997). La fijación de fibrinógeno y otros ligandos al complejo GPIIb/IIIa activado induce un cambio conformacional tanto en el ligando como en el receptor, que da lugar a la expresión de nuevos epítomos denominados RIBS (sitios de unión inducidos por el receptor;

Ugarova *et al*, 1993) y LIBS (sitios de unión inducidos por el ligando), respectivamente. La exposición de los LIBS ocurre a la vez que se produce un agrupamiento de los receptores en la membrana, seguido de la unión de GPIIb/IIIa al citoesqueleto y la agregación plaquetaria (Plow *et al*, 1992).

Recientemente, se ha demostrado la existencia de actividad tiol-isomerasa en la subunidad GPIIIa, predicha por la presencia del tetrapéptido CGxC en cada repetición rica en cisteína (O'Neill *et al*, 2000). Esta actividad enzimática endógena sugiere que los puentes disulfuro de la integrina o de sus sustratos podrían modificarse localmente durante la activación del complejo GPIIb/IIIa. De hecho, se ha observado un aumento de grupos tiol libres en la superficie de plaquetas activadas (Burgess *et al*, 2000) y a su vez, existen mutaciones en los dominios ricos en cisteína que provocan la activación permanente de esta integrina (Kashiwagi *et al*, 1999).

1.4. PATOLOGÍA DEL RECEPTOR DE FIBRINÓGENO: TROMBOASTENIA DE GLANZMANN

La tromboastenia de Glanzmann (TG) es un trastorno hemorrágico hereditario, de carácter autosómico recesivo, caracterizado por un fallo plaquetario para unir fibrinógeno y agregarse en respuesta a agonistas fisiológicos (Caen *et al*, 1966; George *et al*, 1990). Este desorden es debido a un déficit cuantitativo o cualitativo del receptor plaquetario de fibrinógeno (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$). Fue en 1918 cuando el pediatra suizo E. Glanzmann describió, por primera vez, a un grupo de pacientes con síntomas hemorrágicos y plaquetas con agregación débil (“asténica”) o ausente (Glanzmann, 1918). Estudios posteriores demostraron que las plaquetas de estos pacientes no se agregaban en respuesta a agonistas y se observó que la concentración de fibrinógeno plaquetario y la retracción del coágulo estaban claramente disminuidas o eran prácticamente nulas. En 1974, Nurden y Caen descubrieron que las plaquetas de los pacientes con tromboastenia carecían o eran deficientes en las glucoproteínas de membrana GPIIb y GPIIIa (Nurden y Caen, 1974). Más adelante se identificaría al heterodímero formado por estas dos proteínas como un receptor de fibrinógeno y de otras proteínas de adhesión que era indispensable para la agregación plaquetaria.

La TG es poco frecuente aunque se han descrito casos en todo el mundo. Al heredarse de modo autosómico recesivo, se ha encontrado con mayor frecuencia en poblaciones donde hay un elevado número de matrimonios consanguíneos como en la

población judío-iraquí de Israel o entre familias gitanas (Seligsohn y Rososhansky, 1984; Schlegel *et al*, 1995). Los portadores heterocigotos poseen una disminución del 50-60% en los niveles de GPIIb/IIIa, pero no presentan trastornos hemorrágicos y tienen una función plaquetaria prácticamente normal. Los síntomas de esta enfermedad pueden desarrollarse desde los primeros días de vida (púrpuras, petequias, epistaxis, o hemorragia gingival) y el diagnóstico clínico se basa en características comunes de todos los pacientes como son: tiempo de hemorragia prolongado; retracción del coágulo ausente o reducido; agregación plaquetaria deficiente; número, morfología y tamaño de las plaquetas así como la respuesta a ristocetina son normales. Un ensayo importante para el diagnóstico de la tromboastenia de Glanzmann es medir la unión de anticuerpos monoclonales a las plaquetas para determinar el contenido de GPIIb/IIIa. Cuando la alteración de GPIIb/IIIa es cualitativa, el estudio de la unión del fibrinógeno permite evaluar la capacidad funcional del receptor.

La tromboastenia de Glanzmann clásicamente se ha subdividido en 3 tipos en función de la capacidad de retracción del coágulo y el contenido plaquetario de GPIIb/IIIa (George *et al*, 1990): En el tipo I, la retracción del coágulo es nula y los niveles de GPIIb/IIIa son inferiores al 5% del contenido normal; en el tipo II, la retracción del coágulo es normal, pero el contenido del receptor es sólo de un 10-20% del normal; finalmente, en los pacientes clasificados como “variantes”, la retracción del coágulo varía de la ausencia a la normalidad y el porcentaje de GPIIb/IIIa es normal o casi normal, pero este receptor presenta anomalías funcionales.

El conocimiento de la secuencia y organización estructural de GPIIb y GPIIIa ha permitido detectar más de 40 mutaciones en ambos genes asociadas a tromboastenias (French, 1998). Se han descrito inserciones, deleciones, inversiones, mutaciones puntuales que provocan la sustitución de un aminoácido o la aparición de un codón de terminación y mutaciones que afectan al procesamiento y estabilidad del RNA mensajero. Tanto mutaciones en el gen de GPIIb como en el de GPIIIa pueden ser causantes de esta enfermedad, pues ambas subunidades son imprescindibles para la biosíntesis y función del receptor. Para determinar si el defecto genético responsable del fenotipo tromboasténico está localizado en GPIIb o en GPIIIa, es útil determinar los niveles de $\alpha_v\beta_3$. La ausencia o disminución de este complejo indica anomalías en GPIIIa mientras que si el paciente mostrara niveles normales de $\alpha_v\beta_3$ sería indicativo

de alguna lesión en la subunidad GPIIb. Las mutaciones naturales en GPIIb/IIIa asociadas a tromboastenia constituyen un material de estudio de gran importancia para dilucidar la correlación estructura-función del complejo GPIIb/IIIa.

2- OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo occidental y las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la génesis y mantenimiento de dichas enfermedades (Oates *et al*, 1988; Davies, 1994; Falk, 1995). Esta idea esta basada en la experimentación en modelos animales de isquemia vascular que demuestran la importancia de las plaquetas, tanto en el comienzo como en la progresión y empeoramiento de los procesos trombóticos (Folts *et al*, 1982; Yasuda *et al*, 1990; Meyer *et al*, 1994). La demostración de que la falta de agregación plaquetaria, que se observa en la tromboastenia de Glanzmann, se asocia a un déficit cualitativo o cuantitativo del receptor de fibrinógeno, heterodímero GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), justifica el interés en el desarrollo de terapias antitrombóticas basadas en el bloqueo del receptor GPIIb/IIIa. En este sentido, anticuerpos monoclonales contra GPIIb/IIIa han demostrado ser eficaces agentes antitrombóticos (Coller *et al*, 1983; Coller *et al*, 1991). El tratamiento con un fragmento Fab humanizado de un monoclonal murino contra GPIIb/IIIa ha sido utilizado con éxito para evitar la reoclusión vascular y disminuir la tasa de mortalidad (Topol *et al*, 1997; Lincoff *et al*, 1997). Estas observaciones han llevado a reconocer la importancia del estudio de la fisiopatología del receptor de fibrinógeno. El mecanismo de activación de este receptor, es decir, la sucesión de acontecimientos que permiten la fijación de ligando con alta afinidad y, por tanto, la agregación celular aún no ha podido ser desvelado. El conocimiento de este proceso podría facilitar la base para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Por otro lado, el receptor de fibrinógeno pertenece a la superfamilia de receptores heterodiméricos involucrados en fenómenos de reconocimiento, adhesión, migración y agregación celular, esenciales para procesos tan aparentemente dispares como el control del desarrollo, la progresión de tumores o la respuesta inmune. Por tanto, el progreso de la fisiopatología de una de estas integrinas podría, eventualmente, contribuir al mejor conocimiento de una amplia variedad de procesos patológicos. A pesar de su importancia biológica, en conjunto, el conocimiento acerca de la biología celular y molecular de estas proteínas es aún muy limitado, probablemente debido a su complejidad estructural y a la falta de modelos experimentales adecuados para su estudio. Por tal razón, proponemos analizar los modelos que ofrece la naturaleza, es decir, casos de patología molecular plaquetaria,

concretamente tromboastenia de Glanzmann. La tromboastenia de Glanzmann es una enfermedad caracterizada por diátesis hemorrágicas desde el nacimiento, asociada a defecto cuantitativo o funcional del receptor plaquetario de fibrinógeno. Si bien la incidencia de esta enfermedad es escasa, su interés científico es muy elevado, dado que es uno de los dos casos conocidos de patología humana asociada a alteraciones estructurales de una integrina. Por tanto, utilizaremos este modelo para desvelar la lesión genética subyacente y tratar de establecer una correlación precisa entre cambios estructurales y alteración funcional. Naturalmente, este tipo de estudio sólo será posible en aquellos casos en los que la lesión genética no impida la producción de RNAm conteniendo la región codificadora completa de estas proteínas.

Observaciones recientes del laboratorio en el que he desarrollado mi trabajo habían cuestionado la idea de que la disminución del contenido plaquetario de GPIIb/IIIa en casos de portadores de mutaciones heterocigotas fuese simplemente el resultado de una menor disponibilidad de mRNA. Por tal razón, hemos considerado del mayor interés el determinar si la disponibilidad de RNAm es limitante para la expresión superficial de receptores GPIIb/IIIa. Para ello, hemos puesto a punto técnicas de determinación cuantitativa de RNAm con el fin de establecer la correlación existente entre los niveles de mensajeros y la expresión de GPIIb/IIIa en plaquetas de individuos normales. Por la misma razón, consideramos de interés analizar si la mencionada disminución en la tasa de expresión de GPIIb/IIIa en mutaciones heterocigotas podría ser debida a un efecto “dominante negativo” de las formas mutadas de proteínas o el resultado de interacciones anómalas con chaperonas del retículo endoplasmático.

El análisis funcional de cDNAs mutantes permite aclarar si la mutación objeto de estudio está asociada al déficit de receptores en la superficie plaquetaria; no obstante, este tipo de análisis no aclara si es la pérdida del residuo normal o la presencia del nuevo residuo, la causante de la disfunción. En estos casos es útil, y así se ha hecho, realizar una mutagénesis de dicho residuo siendo substituido por otros de naturaleza dispar. La mutagénesis como medio experimental para establecer una correlación precisa entre estructura y función de estas macromoléculas es un procedimiento útil, aunque costoso, lento, técnicamente complejo y de resultados inciertos; no obstante, su uso puede ser gratificante si existe un criterio claro de los residuos a mutar, basado en observaciones previas. Mutaciones en el gen GPIIIa, caracterizadas previamente en nuestro laboratorio, que dan lugar a formas truncadas de dicha proteína ofrecen un

modelo de gran interés para dilucidar los requerimientos estructurales mínimos para que tenga lugar la heterodimerización y expresión superficial de GPIIb/IIIa. En base a estas observaciones consideramos de gran interés el realizar un análisis delecional de GPIIIa y, eventualmente, caracterizar funcionalmente los complejos resultantes.

En resumen y en base a las razones expuestas, los principales objetivos de esta tesis han sido:

- 1.- Análisis genético-molecular de GPIIb/IIIa de fenotipos tromboasténicos.
- 2.- Analizar las posibles etapas limitantes para la expresión superficial de complejos GPIIb/IIIa.
- 3.- Mutagénesis de regiones específicas de GPIIb o de GPIIIa orientadas a la identificación de dominios de importancia funcional.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

El análisis de los genes de las glucoproteínas GPIIb y GPIIIa se realizó a partir de DNA genómico extraído de sangre periférica de pacientes, familiares e individuos control. Se adicionan a las muestras de sangre anticoagulantes como EDTA, heparina o citrato sódico. Para la obtención del DNA genómico, primero se lisan los hematíes añadiendo 5 volúmenes de tampón de lisis (NH_4Cl 0,5 M, KHCO_3 0,01 M, EDTA 0,1 mM) e incubando 15 minutos en hielo. Después de centrifugar 5 minutos a 400 x g, el sedimento se trata con un tampón de digestión (NaCl 100 mM, Tris-ClH pH 8 10 mM, EDTA pH 8 25 mM, SDS 1%, proteinasa K 2 mg/ml) a 50 °C durante 12-24 horas. El DNA se precipita con medio volumen de acetato amónico 7,5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Las hebras de DNA se enrollan en una varilla de vidrio estéril, se lavan con etanol 70% y se dejan secar para finalmente resuspenderse en TE pH 8 (Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM).

3.2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Se extrajo RNA total de plaquetas o líneas celulares siguiendo el método de Chomczynsky y Sachi (1987). Las células previamente lavadas, se lisan con una solución desnaturante de tiocianato de guanidinio 4 M. Las proteínas y el DNA se separan con 1/10 de volumen de acetato sódico 2M, un volumen de fenol pH 4 saturado con H_2O y 1/20 de volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Tras centrifugar, el RNA queda en la fase acuosa y se precipita con isopropanol. Se trata de nuevo con la solución desnaturante y se vuelve a precipitar con isopropanol. Tras lavar con etanol 75%, el RNA se resuspende en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para inhibir RNasas que pudieran degradar la muestra. La cantidad de RNA se determinó mediante absorción a 260nm y se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio. En algunos casos, para eliminar posibles contaminaciones de DNA genómico, el RNA se trata con DNasa I libre de RNasas (7,5 U) a 37 °C durante una hora y a continuación se inactiva por extracción con fenol o incubando a 75 °C durante 5 minutos.

3.3. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS

Para la amplificación, síntesis o secuenciación de DNA se utilizaron oligonucleótidos que corresponden a secuencias del DNA complementario (cDNA) de GPIIb o GPIIIa y de regiones intrónicas próximas a los exones de ambos genes. El diseño de estos oligonucleótidos se realizó con el programa OLIGO versión 4.05 (Primer analysis software. 1992. © Wojciech Rychlik. National Biosciences, Inc. Plymouth, MN) para evitar la formación de horquillas o dimerizaciones con los otros oligonucleótidos de la reacción (Tablas II, III y IV).

Para la cuantificación de RNAs mensajeros por el sistema TaqMan (Perkin-Elmer) se diseñan sondas de aproximadamente 25 pb, cuya secuencia hibrida de modo específico con el fragmento de cDNA que se sintetiza y amplifica por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Esta sonda presenta la particularidad de llevar un marcador fluorescente (“Reporter”) en el extremo 5’ denominado FAM (6-Carboxi-fluoresceína) y llevar otro fluoróforo supresor del primero (“Quencher”), denominado TAMRA (6-Carboxitetrametil-rodamina) que va unido al extremo 3’ evitando su extensión durante la reacción. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del marcador y el supresor es suficiente para que se evite la fluorescencia de FAM. Durante la amplificación por PCR, la sonda hibrida entre los dos oligonucleótidos utilizados y debido a la actividad nucleolítica 5’→3’ de la DNA polimerasa esta sonda será degradada, y de este modo, el fluoróforo supresor se separa del marcador, aumentando así su fluorescencia y permitiendo cuantificar el grado de amplificación de la muestra. Estas sondas deben satisfacer los siguientes requisitos: (1) longitud de 20-40 pb para asegurar una buena hibridación y especificidad; (2) contenido de GC del 40-60% y no tener muchas bases iguales seguidas; (3) evitar sondas que pudieran hibridar con los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR; (4) la temperatura (T_m) será al menos 5 °C mayor que la de los oligos, para asegurar que la sonda hibride de manera más estable que estos. Finalmente, para evitar hibridaciones inespecíficas, se comprueba que las secuencias de las sondas no muestran identidad con ninguna otra conocida. La síntesis de las sondas fue realizada por Perkin-Elmer.

Tabla II

**OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS
PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS
DEL cDNA DE GPIIb Y GPIIIa**

Oligo	Secuencia (5' -> 3')
Ib-17S21	GTTGTGGAAGAAGGAAGATGG
Ib550S23	CGCATTACGTGGAAAATGATTT
Ib744A19	GGACACGTGCCACAAAAGG
Ib955S25	TATTTTGGGCATTCAGTGGCTGTCA
Ib975A20	AGCCACTGAATGCCCAAAT
Ib1275A21	ACCCAGGAACACCAGCACTTG
Ib1513A25	CACAGCTCTTCACAGCAGGATTCAG
Ib1901A20	CCACCGTCCAGGACGATTC <u>G</u>
Ib1965S21	AGTTGGGGCAGATAATGTCTT
Ib2086A21	TGCTTAGGGCCC GCATGTAGT
Ib2123A21	TTCTGATTACAGATGAGTCTC
Ib2425S19	CCCAAAGTGGAGCACACCT
Ib3099A21	TTCTTCCAGGGGTGGCCGGTT
Ib3154A21	CAACCCTCCTGCTAGAATAGT
IIIa-16S18	GCGGGAGGCGGACGAGAT
IIIa1187S21	TCAATGCCACCTGCCTCAACA
IIIa1444S20	GAGTGTGGGGTATGCCGTTG
IIIa1463A21	CAACGGCATACCCCACACTCA
IIIa1517A20	GGGCGATAGTCCTCCTCTGA
IIIa2235S19	CACCATCCACGACCGAAAA
IIIa2366A23	TAAGTGCCCCGGTACGTGATATT
IIIa2407A21	TGGCACAGGCTGATAATGATC
IIIa2439A20	TGTAAACATGATGGCAGGGA

Las secuencias de cDNA humanas de GPIIb (nº de acceso M34480) y GPIIIa (nº de acceso M35999) mencionadas son las descritas por Frchet *et al*, 1990. La denominación del oligonucleótido usado en RT-PCR se compone (en orden) de: tipo de gen (Ib para GPIIb y IIIa para GPIIIa), localización del extremo 5' en la secuencia de cDNA (la "A" del codon "ATG" de la "Met" iniciadora es +1), dirección del oligo en el cDNA (S: sense; A: antisense), y, finalmente, la longitud del oligo (nt).

Tabla III

**OLIGONUCLEÓTIDOS DEL GEN GPIIb PARA ANÁLISIS DE
POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE DNA MONOCATENARIO**

Nombre y Secuencia (5'->3') del Oligo "Sense"	Exón	Tamaño del prod. PCR(pb)	Nombre y Secuencia (5'->3') del Oligo "Antisense"
1S: TGGAGGAATCTGAAGGGAAG	1	346	1AS: TATCGCAAATGGGAAACTCG
2S: GGGCCTGGGATACGCTGGAAT	2→4	734	4AS: CCAGATCCAAAGCAAGGGC
5S: GGCTGACCCCTCCTCCTTGT	5→7	442	7AS: CTGGAAGTCTGGAATGGCGGT
8S: CTCTGTGCTTCCTCCCTGG	8→9	350	9AS: AGCCTGAGAACTGGGATAAG
10S: CTGGAGTGGGAGGTTGCTTTG	10→11	369	11AS: GCAGCTCTGGTAATTTGGGAC
12S: CAATATACCCCTGGTCCAGT	12	333	12AS: CTCAGGCCAACTCCATGCTT
13S: AATAACAATCAGCCACTTCCT	13	270	13AS: CCTTTCTTGGGCATTTCTAGC
14S: ATTCTGACCCATTCCTCGAT	14→16	469	16AS: AGTCCAAGCCCACCTCCCTC
17S: AGGGAGGTCCCTGACTCTTCTG	17	224	17AS: TACTCTCCCAGCCCTGCCAAT
18S: AGGTGGGATGTGTATGGTAGC	18	252	18AS: ACTTGGCACTAACCCATAATCC
19S: TAAACCTCACACATCCCCAAC	19	184	19AS: AAGGTGTGGAGCAGGTATGAT
19S: TAAACCTCACACATCCCCAAC	19→20	500	20AS: AAAGCAGAAGAGAAGAGGGACT
21S: TATATGATGCTCTGTAATTTT	21	194	21AS: TCTGGTTATTCATGAGCCCCCT
22S: TGAAGACTGGAGGCCACATT	22	209	22AS: TCAGACGGGGGAAGGGTGGT
23S: CCTCACCCCCAGAAAGTCACT	23→24	427	24AS: ACCCGGAGTTCTGAGGACC
25S: AGCGGGTCCTCAGAACTCC	25→26	530	26AS: CCCTCCTCCCATCCCCTCTG
27S: ATGATGGGGTGATGGGCCGGGA	27	245	27AS: ACACCAAACCCGCCCTCCCA
28S: ACTCCGTGCAACCAATAGGC	28	238	28AS: CTTTTCTGGCTGGGCACTGA
29S: GAAAGGCAGGTGTCAAGGTGA	29	244	29AS: TCTCTCCTTGACTCCCTGTGA
30S: ATACTTCCTCACATGTGCTCT	30	167	30AS: CAACCCTCCTGCTAGAATAGT

Las secuencias de oligonucleótidos corresponden a zonas intrónicas que delimitan los distintos exones de GPIIb. La nomenclatura de cada oligonucleótido indica el exón que es amplificado y si es "sense" o "antisense", señalado por S ó AS, respectivamente. Los productos de "PCR" mayores de 300 pb fueron digeridos con el enzima(s) de restricción adecuado para generar fragmentos de menor tamaño y facilitar su análisis por "SSCP".

Tabla IV

**OLIGONUCLEÓTIDOS DEL GEN GPIIIa PARA ANÁLISIS DE
POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE DNA MONOCATENARIO**

Nombre y Secuencia (5'→3') del Oligo "Sense"	Exón	Tamaño	Nombre y Secuencia (5'→3') del Oligo "Antisense"
		del prod. PCR(pb)	
1S: GCCTTTGTCTGTCTGTTGCA	1	130	1AS: AAGGTCTGGTATCTGCTCC
2S: GACTTCTCTTTGGGCTCCTG	2	280	2AS: TGCTCTATGCCCACCTGCTT
3S: TTATTCAATCTTGGTGGA	3	341	3AS: GATGCTGTCTGGCGTCTGG
4S: GTCTGCTTAAATTATCTCCC	4	244	4AS: AGCCACAGCTGGCACTCCAAGTCCTCCA
5S: AGTGACATGGCTGAATTTG	5	301	5AS: TATTCACACAGACTCTGCCTA
6S: GACGTCATTAACCTCTACAT	6→7	650	7AS: GACTATTCCCAGCACAAGAC
8S: AATTTCTTGTCTTCTTGTGC	8	211	8AS: CACAGATGCTCCAGGACAAA
9S: GGCCCAACTGTGTCTAAATAC	9	521	9AS: GTATATGAGGGGTGTGGGTT
10S: ACCTTCCTGGGCTGTGTGT	10	299	10AS: GATCCTCTCCTACCTCCCAG
11S: GGGATACGCTTAGGCTTGCT	11	198	11AS: AACCTGGGTGTGTGCAACTCT
12S: ATCTTCCAGTAGTTGTCTCAC	12	250	12AS: GATGAGTAGAGATTCTGCCT
13S: ATAGGCCAGGTTCAAGTGA	13	284	13AS: CTTAAGAGTCTCAGACCAATG
14S: AGTCACTGTAAGATGCTATTTC	14	173	14AS: TGTAAACATGATGGCAGGGA

Las secuencias de oligonucleótidos corresponden a zonas intrónicas que delimitan los distintos exones de GPIIIa. La nomenclatura de cada oligonucleótido indica el exón que es amplificado y si es "sense" o "antisense", señalado por S ó AS, respectivamente. Los productos de "PCR" mayores de 300 pb fueron digeridos con el enzima(s) de restricción adecuado para generar fragmentos de menor tamaño y facilitar su análisis por "SSCP".

3.4. AMPLIFICACIÓN, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE DNA GENÓMICO Y cDNA

Los exones de los genes de GPIIb y GPIIIa se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al*, 1986, 1987). En general, las amplificaciones se realizaron a partir de 0,1-0,5 µg de DNA genómico en un volumen final de 25-100 µl, con 1-2 U de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer o Ecogen), 10-20 pmoles de cada oligonucleótido y 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTPs). Las concentraciones de MgCl₂ y las temperaturas de hibridación de cada PCR serán las más óptimas para cada pareja de oligonucleótidos. Estas reacciones se llevaron a cabo en termocicladores GenAmp PCR system 9600 y 2400 de la firma Perkin-Elmer.

Los productos de PCR resultantes tendrán una desoxiadenina adicional en el extremo 3' de cada hebra debido a que la enzima Taq DNA polimerasa carece de actividad 3'→5' exonucleasa. Esto permite que sean clonados directamente en un "vector T" (Marchuk *et al*, 1991) que posee una desoxitimina en los extremos 3', como pCR2.1 de Invitrogen. Los fragmentos amplificados y el vector se ligan con 4 U de T4 DNA ligasa a 16 °C. Con esta ligación se transforman células competentes de *E. coli* y las colonias se seleccionan con X-Gal, pues sólo el plásmido recombinante carece de β-Galactosidasa. De estas colonias se extrae el DNA plasmídico mediante lisis alcalina (Morelle, 1989) o mediante kits comerciales (Wizard, Promega). El producto de amplificación de DNA se analiza por digestión con enzimas de restricción. El DNA amplificado se secuencía por el método de terminación de cadena (Sanger *et al*, 1977) con T7 DNA polimerasa y ³⁵S-dATP. Los productos de la secuenciación se resuelven en geles desnaturizantes de acrilamida 6%-Urea 7 M que una vez secos se exponen con una película autoradiográfica (X-Omat AR, Kodak). En otros casos, la secuenciación se realizó con un secuenciador automático modelo ABIprism 377 de Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, CT).

Para la amplificación y secuenciación de cDNA se realiza primero la síntesis del cDNA por la enzima transcriptasa inversa (MuLV, Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) a partir de 0,5-1,5 µg de RNA desnaturizado y 10 pmoles del oligonucleótido 3' específico. En la amplificación por PCR se utiliza como templado

una alícuota de la reacción de síntesis y la secuenciación se realiza a partir de los productos amplificados o previa clonación en vectores T, como se ha descrito anteriormente.

3.5. ANÁLISIS DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE DNA MONOCATENARIO (SSCP)

La técnica del SSCP se basa en las diferencias de migración electroforética del DNA, debidas a la estructura secundaria que adopta al desnaturalizarse según su secuencia nucleotídica. El cambio de una sola base es suficiente para dar lugar a cambios en la movilidad electroforética (Orita *et al*, 1989; Hongyo *et al*, 1993). Se analizan productos de PCR purificados de geles de agarosa y en el caso de que superen los 300 pb, se digieren previamente para asegurar una mejor resolución. Las muestras se desnaturalizan por calentamiento durante 5 minutos a 100°C en un tampón compuesto por 47% de formamida, EDTA 10 mM, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% xileno-cianol. Tras la desnaturalización, las muestras se enfrían en hielo y se cargan en un gel del 12-16% poliacrilamida (39:1, acrilamida:bis-acrilamida) con o sin glicerol (8,7%). La electroforesis se realiza a 5-10 watios/gel durante 5 h. manteniendo la temperatura a 12-15 °C. Finalmente, las bandas se visualizan mediante tinción con sales de plata (Silver Stain Plus, Bio-Rad).

3.6. AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE ALELOS MEDIANTE PCR (ASPCR)

Esta técnica se emplea para verificar la existencia de mutaciones puntuales en DNA genómico y determinar el estado de portador de los familiares, en especial cuando las mutaciones encontradas no alteran el patrón de restricción. La DNA polimerasa requiere un apareamiento correcto del nucleótido del extremo 3' del oligo para ser capaz de extender la hebra de DNA durante la amplificación por PCR, por ello, para este análisis se diseñan oligonucleótidos que poseen un extremo 3' complementario con el alelo normal o con el mutado, de modo que según se añada uno o otro, solo se podrá amplificar el alelo correspondiente (Wu *et al*, 1989).

3.7. VALORACIÓN DEL CONTENIDO PLAQUETARIO DE GPIIb, GPIIIa Y FIBRINÓGENO

Las plaquetas fueron obtenidas a partir de sangre periférica recogida directamente en tubos conteniendo EDTA o citrato sódico. La sangre fue extraída con el consentimiento informado de los donantes, pacientes y familiares. Primero se obtuvo el plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación diferencial de la sangre a 120 x g durante 20 min., a temperatura ambiente. A partir del PRP, las plaquetas se sedimentan al centrifugar a 1.000 x g durante 10 min. y se lavan con tampón PBS-EDTA 0,5 mM. Después las plaquetas se tratarán según el ensayo que se vaya a realizar.

3.7.1. Enzimoimmunoensayo

Las plaquetas se rompen por sonicación y se ultracentrifugan a 100.000 x g durante 1 h. a 4 °C para separar las fracciones soluble y particulada. El fibrinógeno se cuantifica en el sobrenadante y las glucoproteínas GPIIb/IIIa en la fracción particulada solubilizada con SDS al 3%. La determinación del contenido de GPIIb, GPIIIa y fibrinógeno, se realizó mediante enzimoimmunoensayos (ELISA) competitivos utilizando los anticuerpos monoclonales anti-GPIIb (M3), anti-GPIIIa (P37 y P95.2) y anti-fibrinógeno (F2) (González-Rodríguez *et al*, 1994; Méndez *et al*, 1996) y una dilución 1/2.000 de la inmunoglobulina específica marcada con peroxidasa. Como estándar se usaron GPIIb, GPIIIa y fibrinógeno, purificados a partir de plaquetas humanas.

3.7.2. Análisis de western

Las proteínas (2-20 µg) obtenidas de plaquetas completas o de su fracción particulada se solubilizan con SDS 3%, se someten a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% en condiciones reductoras o no-reductoras y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa de 0,45µ (Bio-Rad). La membrana se bloquea durante 1 hora con leche desnatada en polvo al 10% antes de incubarse durante 16 horas con anticuerpos monoclonales anti-GPIIb o anti-GPIIIa. Después de varios lavados de 5 minutos con PBS-0,1% Tween-20, la membrana se incuba durante 1h. con una dilución 1/3.000 de inmunoglobulina G de conejo anti-ratón conjugada con

peroxidasa (Bio-Rad). Después de otra serie de lavados, las proteínas se visualizan en la membrana adicionando el revelador (H_2O_2 al 0,015% y 0,5 mg/ml de 4-Cloro-1-Naftol en TBS). Las intensidades relativas de las proteínas se cuantifican por densitometría digitalizando primero las bandas con un escáner de alta resolución.

3.7.3. Citometría de flujo

La expresión en superficie de GPIIb/IIIa se detecta por citometría de flujo, empleando en primer lugar anticuerpos monoclonales de ratón frente a GPIIIa (P37), GPIIb (M3, M5 o M4) (Calvete *et al*, 1989), o la integrina $\alpha_v\beta_3$ humanas (Chemicon, Temecula, CA) y en segundo lugar la fracción $F(ab')_2$ de inmunoglobulina de conejo anti-ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (DAKO).

Las plaquetas lavadas (10^6 en 100 μ l de PBS-EDTA 0,5 mM) se incuban primero con 1 μ g del anticuerpo monoclonal específico durante 20 min. El anticuerpo no fijado se retira mediante lavados con PBS-EDTA y se incuban por segunda vez con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína durante otros 20 minutos. Finalmente, las células se lavan y se resuspenden en 300 μ l de tampón PBS-EDTA para su análisis en un citómetro de flujo (modelo EPICS XL-MCL flow cytometry system, Coulter Corporation, USA). En cada muestra se analizan un total de 10.000 plaquetas.

3.8. CUANTIFICACIÓN DE RNAs MENSAJEROS DE GPIIb Y GPIIIa

Se extrae el RNA total de plaquetas y se miden los niveles de RNAs mensajeros de GPIIb, GPIIIa y β -actina realizando RT-PCR al que se adiciona una sonda fluorescente (TaqMan, Perkin-Elmer) específica para cada caso, que permite cuantificar el grado de amplificación.

La amplificación por RT-PCR se realizó por dos procedimientos distintos:
Con rTth DNA Polimerasa: Tanto la transcripción inversa (RT) como la amplificación por PCR se llevan a cabo por la rTth DNA polimerasa (Perkin-Elmer) (Myers *et al*, 1991), que en presencia de Mn^{2+} tiene actividad retrotranscriptasa y en presencia de Mg^{2+} actúa como polimerasa. Primero, se pone en la reacción el RNA, los dNTPs (200 μ M), el oligonucleótido 3' o "antisense" (10 pmoles) y la rTth DNA polimerasa (2,5 U) en presencia de $Mn(OAc)_2$ (1,1 mM) y se incubaba a 60-65 °C durante 30 min.

Después se le adiciona en el mismo tubo un tampón quelante para retirar el Mn^{2+} , el oligo 5' o "sense" (10 pmoles) y $Mg(OAc)_2$ (0,8 mM), y se realiza la reacción de PCR. En cada ciclo de PCR, habrá una primera etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y una segunda de hibridación y extensión de 30-45 seg. a 60-68 °C. *Con MuLV Retrotranscriptasa y AmpliTaq Gold DNA Polimerasa:* Al RNA, desnaturalizado previamente 2 minutos a 80°C, se le adicionan ambas enzimas, Retrotranscriptasa (25 U) y DNA polimerasa (1,25 U), dNTPs (300 μ M), $MgCl_2$ (5 mM), oligonucleótidos 5'y 3' (15 pmoles) e inhibidor de RNasas (10 U) en un volumen final de 50 μ l (Wang *et al*, 1989). Para cuantificación, también se añadirá a la reacción 15 pmoles de sonda fluorescente. La síntesis del cDNA se realiza a 45 °C durante 45 minutos por la retrotranscriptasa MuLV. La AmpliTaq Gold DNA polimerasa se mantendrá inactiva a esta temperatura y únicamente se activará en un paso previo al PCR de 12 minutos a 97 °C. Una vez activada, llevará a cabo la amplificación del cDNA previamente sintetizado por repetidos ciclos a 95 °C, 15 seg. y 60-68 °C, 30 seg.

Sondas específicas (Livak *et al*, 1995) son diseñadas para que hibriden con el correspondiente templado entre los 2 oligonucleótidos del PCR y sean degradadas debido a la actividad nucleolítica 5'→3' de la DNA polimerasa (Tabla V). Esta degradación provoca un aumento en la emisión fluorescente de FAM ("reporter"), sin afectar la emisión de TAMRA ("quencher"). Como la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa actúa sólo sobre la sonda que está hibridada (no hidroliza la sonda libre en solución), el incremento de fluorescencia será proporcional a la cantidad del producto específico de PCR. Después del PCR, 40 μ l de cada muestra son transferidos a un pocillo de una placa y la fluorescencia es medida con un fluorímetro (Modelo LS-50B, PerkinElmer) equipado con un lector de placas. Las condiciones de lectura fueron: longitud de onda de excitación 488 nm; longitud de onda de emisión 518 y 580nm, para FAM y TAMRA respectivamente; y un tiempo de lectura de 2 seg. Las fluctuaciones son normalizadas aplicando 2 cálculos: (1) El Quencher (TAMRA) será un standard interno pasivo. Dividiremos la intensidad de la emisión de FAM entre la de TAMRA para cada reacción, dando el valor definido como RQ(+). Efectos inespecíficos como fluctuaciones en el volumen, son normalizados por esta relación. (2) Otras fluctuaciones son normalizadas, tomando el valor RQ(+) de cada muestra

Tabla V

**OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS UTILIZADOS PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE RNAs MENSAJEROS MEDIANTE EL SISTEMA
TaqMan**

mRNA	Oligonucleótidos	Sondas
GPIIb	IIb550S23: 5'-CGCATTACGTGGAAATGATTT-3' IIb744A19: 5'-GGACACGTGCCACAAAAGG-3'	R-AGTGACCACGGAGCTGAAGCCCG-Q
GPIIIa	IIIa2235S19: 5'-CACCATCCACGACCGAAAA-3' IIIa2366A22: 5'-TAAGTGCCCCGGTACGTGATAT-3'	R-CTCTGGCGCGTTCTTCCTCAAATTTAGC-Q
β-actina	Actina476S25: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' Actina770A25: 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'	R-ATGCCCCCCCCATGCCATCCTGCGT-Q

Los oligonucleótidos para la cuantificación del RNAm corresponden a secuencias de cDNA humanas de GPIIb (nº de acceso M34480), GPIIIa (nº de acceso M35999), y β -actina (nº de acceso NM001101) descritas por Frachet *et al*, 1990 y Ponte *et al*, 1984, respectivamente. La denominación del oligonucleótido usado en RT-PCR se compone (en orden) de: tipo de gen (IIb, IIIa, o Actina), localización del extremo 5' en la secuencia de cDNA (la "A" del codón "ATG" de la "Met" iniciadora es +1), dirección del oligo en el cDNA (S: sense; A: antisense), y, finalmente, la longitud del oligo (nt). Las sondas corresponden también a secuencias específicas de cada cDNA y poseen un marcador fluorescente ("R") en el extremo 5' denominado FAM (6-Carboxi-fluoresceína) y otro fluoróforo supresor ("Q") denominado TAMRA (6-Carboxitetrametil-rodamina) unido al extremo 3'.

que contiene todos los componentes del PCR y restándole el valor del control o blanco RQ(-) que contiene todos los componentes menos el templado. El incremento de RQ [$\Delta RQ = RQ(+) - RQ(-)$] indicará realmente la magnitud de la señal generada en cada muestra. Los cálculos se llevan a cabo mediante un programa de ordenador diseñado específicamente para el sistema TaqMan.

Un requerimiento preliminar de la cuantificación basada en RT-PCR es mantener en fase exponencial el incremento del producto generado, lo cual está condicionado por distintas variables (número de ciclos, concentración de RNA, etc.). En el método utilizado, también interviene la eficacia de la hibridación y la degradación de la sonda. Por estas razones, en ensayos previos a los análisis de las muestras, se determinaron las condiciones experimentales en las que existe una relación lineal entre el número de ciclos y la emisión de fluorescencia (ΔRQ). También se estudió si había linealidad entre el incremento de RQ y el logaritmo de la concentración inicial de RNA. Los productos de amplificación se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, para verificar la presencia de una sola banda del tamaño esperado.

3.9. CLONACIÓN DE LOS cDNAs DE GPIIb Y GPIIIa EN VECTORES DE EXPRESIÓN

3.9.1. Construcción de vectores de expresión con las formas mutantes de cDNA de GPIIb

Se parte del cDNA de GPIIb silvestre, subclonado en pGEM-4Z (Promega) entre EcoRI y HindIII, en el cual se introducen mutaciones puntuales mediante PCR, por el método de extensión de fragmentos por solapamiento (Horton *et al*, 1989). En una primera amplificación, se generan dos fragmentos solapables: para el fragmento 5' se utiliza un oligonucleótido antisense en cuya secuencia se introduce la mutación deseada y para el fragmento 3' procedemos de igual manera pero será el oligonucleótido sense el portador de la mutación. Ambos productos se tratan con el fragmento Klenow para eliminar las desoxiadenuinas de los extremos 3' y se purifican. Con los fragmentos solapables así obtenidos, se realiza una segunda amplificación utilizando el oligonucleótido sense del fragmento 5' y el antisense del 3'. El cDNA de GPIIb silvestre, clonado en pGEM-4Z, se digiere con dos enzimas para eliminar un fragmento que será sustituido por él que generan las mismas enzimas al cortar el

producto de PCR portador de la mutación. Así obtenemos el cDNA de GPIIb mutado, cuya secuencia se verifica mediante secuenciación en ambas direcciones (Tabla VI).

Para facilitar la clonación en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen), se introdujo un "linker" (secuencia de unión) en el sitio EcoRI de la construcción pGEM4Z-GPIIb-cDNA. De esta forma se pudo subclonar GPIIb mediante ligación cohesiva en el sitio HindIII de pcDNA3.

3.9.2. Clonación de los cDNAs de GPIIIa normal o mutante en vectores de expresión

El cDNA de GPIIIa silvestre clonado entre los sitios EcoRI y HindIII de pBluescript II-KS (Stratagene) se digiere con XhoI y parcialmente con BamHI y se subclona en el vector de expresión pcDNA3.

El cDNA de GPIIIa[Δ616] mutante se preparó también con el procedimiento de extensión de fragmentos por solapamiento mediante PCR. El cDNA de GPIIIa silvestre contenido en el plásmido pBluescript II-KS se utilizó como templado. El segmento 5' se amplificó con el oligonucleótido sense IIIa (1670-1689): 5'-ACTGCAACTGTACCACGCGT-3' y el oligonucleótido antisense mutado (1861-1839): 5'-AACTTCTTACACTACACCAT-3'; el fragmento 3' se obtuvo usando el oligonucleótido sense mutado (1837-1857): 5'-GAATGTGTGTAGTGTAAGAAG-3' y el oligonucleótido antisense IIIa (2319-2296) XhoI: 5'-TGATAATGACTCGAGGATGACTGC-3'. Las bases sustituidas para generar la mutación en las secuencias solapables están subrayadas. Los productos de PCR 5' y 3' se utilizaron como templado en una nueva ronda de amplificación por PCR con los oligonucleótidos sense IIIa (1670-1689) y antisense IIIa (2319-2296) XhoI, anteriormente descritos. El fragmento amplificado fue digerido con XhoI y NotI, y el producto de digestión de 581 pb se reemplazó por el homólogo de secuencia correcta en la construcción pcDNA3-GPIIIa.

Para la construcción de la forma mutante GPIIIa[Δ693] se realizó un PCR a partir del plásmido pcDNA3-IIIa con el oligonucleótido sense IIIa (1670-1689) y el antisense IIIa-693stop-XhoI: 5'-TATCTCGAGTTAGTCAGGGCCC-3'. El producto

Tabla VI

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA INTRODUCCIÓN DE MUTACIONES EN EL cDNA DE GPIIb POR EL MÉTODO DE EXTENSIÓN DE FRAGMENTOS POR SOLAPAMIENTO

GPIIb mutante:	Oligonucleótidos empleados:	Fragmento sustituido:
[674R]	S: 5'-GAGACTCATCCGTAATCAGAA-3' AS: 5'-TTCTGATTACGGATGAGTCTC-3'	AccI-BamHI
[687A] [674R-687A]	S: 5'-CAGGGTGG TGCTGGCTGAG-3' AS: 5'-AGCTCAGCCAGCACCACCCT-3'	AccI-BamHI
[674A] [674A-687A]	S: 5'-GAGACTCATCGCTAATCAGAAGAA-3' AS: 5'-TTCTTCTGATTAGCGATGAGTCTC-3'	AccI-BamHI
[324K]	AS: 5'-CGCCCCACTTTGGCCAGTTTT-3'	NotI-AccI
[324R]	AS: 5'-CGCCCCACTCTGGCCAGTTTT-3'	NotI-AccI
[324D]	S: 5'-CTGGCCGATGTGGGGCGTGTG-3'	NotI-AccI
[324Q]	S: 5'-CTGGCCCAAGTGGGGCGTGTG-3'	NotI-AccI
[324S]	S: 5'-CTGGCCTCAGTGGGGCGTGTG-3'	NotI-AccI
[324A]	S: 5'-CTGGCCGCAGTGGGGCGTGTG-3'	NotI-AccI
[288delC]	S: 5'-TGCCC(C)TCGCTGCTCTTTGACCT-3' AS: 5'-CAAAGAGCAGCGAGGG(G)CACT-3'	SacII-NotI
[Δ597]	S: 5'-AGACATGAATCGTCCTGGACT-3' AS: 5'-CCAGGACGATTCATGTCTGCT-3'	AccI-BamHI

Los cDNAs de las formas GPIIb mutantes se denominan: por la posición y el aminoácido intercambiado en las sustituciones; por el último residuo de la proteína truncada en el caso de un codón prematuro de terminación; o por el número y nucleótido del cDNA deleciónado. Los oligonucleótidos empleados corresponden a secuencias de cDNA adyacentes a las bases que se sustituyen o eliminan para generar la mutación (bases subrayadas o entre paréntesis, respectivamente). La dirección del oligo se indica como "S" (Sense) o "AS" (Antisense). El fragmento de PCR, producto de digestión de los enzimas indicados para cada caso, será el sustituido en el cDNA de GPIIb silvestre.

de PCR, portador de la mutación deseada, se digiere con NotI y XhoI para poder sustituir este fragmento en el vector original pcDNA3-IIIa.

El cDNA de GPIIIa- Δ (616-690) se obtuvo amplificando el plásmido pBJ1-IIIa con el oligo antisense IIIa (1845-1819): 5'-CACACATTCTTTCTTAAAGGTGCAGGC-3', anterior a la zona que se quiere deletar, y el oligo sense IIIa (2071-2092): 5'-CCTGACATCCTGGTGGTCCTGC-3', posterior a la delección. De este modo, amplificamos la totalidad del plásmido que contiene el cDNA de GPIIIa a excepción de la región que deseamos eliminar. Relingando este producto de PCR con T4 DNA ligasa, obtuvimos el vector pBJ1-IIIa- Δ (616-690), que se utiliza como templado en una nueva amplificación por PCR con el oligo sense IIIa (1670-1689) y antisense IIIa (2319-2296) XhoI. Como en los casos antes descritos, el producto de digestión NotI-XhoI de este PCR se sustituye en el plásmido pcDNA3-IIIa normal.

La secuenciación de estas construcciones confirmó la correcta inserción del producto mutante y la ausencia de posibles errores causados por la polimerasa durante la PCR.

3.10. EXPRESIÓN DE GPIIb Y GPIIIa EN CÉLULAS CHO

3.10.1. Transfecciones transitorias

Células de ovario de hámster chino (CHO) o CHO-IIIa (clon que expresa de modo estable la glucoproteína humana GPIIIa) se cultivan en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado, L-glutamina (580 mg/l) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina). Cuando las células se encuentran en fase exponencial de crecimiento, se transfectan con el plásmido pcDNA3-GPIIIa y/o pcDNA3-GPIIb, normal y/o mutado, mediante tratamiento con dietilaminoetil-dextrano (DEAE -Dextrano; Gulick, 1997). Como control negativo, se transfecta en paralelo el plásmido vacío pcDNA3.

El DNA (5-15 μ g) se añade a medio DMEM con 2,5% de FBS y difosfato de cloroquina 100 μ M. Después se adiciona DEAE-Dextrano (100-150 μ g/ml) que formará complejos con el DNA para que este pueda ser introducido en la célula por endocitosis. Las células se incuban a 37 °C, en atmósfera de 5% CO₂, durante 3-4 horas, con el medio que contiene el DNA y DEAE-Dextrano. Transcurrido este

tiempo, se tratan con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, durante 6 minutos a temperatura ambiente, para mejorar la eficacia de la transfección. Después de lavar las células con PBS, se incuban en medio DMEM completo. A las 48-76 h. se analiza la expresión de GPIIb y/o GPIIIa en las células transfectadas por citometría de flujo y/o inmunoprecipitación. En los casos necesarios, la eficacia de la transfección se confirma cotransfectando 2,5 µg del plásmido pCMV-β-galactosidasa. La actividad β-gal de cada muestra se mide mediante un espectrofotómetro utilizando 2-nitrofenil-β-galactopiranosido como sustrato (MacGregor *et al*, 1991).

3.10.2. Transfecciones estables

Células CHO se transfectan con pcDNA3-GPIIIa y pcDNA3-GPIIb, silvestre y/o mutado, por el método del precipitado de fosfato cálcico (Graham *et al*, 1973). Se mezcla el DNA (10-20 µg) y el cloruro cálcico 2,5M con un tampón salino 2x HeBS. Después de 20 min. se forma un precipitado, el cual se añade a las células. A las 16 horas se cambia el medio y a las 48 horas se añade medio fresco con Geneticina (G-418, SIGMA, 400 µg/ml) para seleccionar las células que hayan incorporado el vector de expresión y sean resistentes al antibiótico. El medio de cultivo se cambia cada 3-4 días hasta que se puedan detectar clones aislados, los cuales se recogen con discos de papel 3MM empapados con tripsina y se cultivan en placas individuales. Los clones se analizan por citometría y/o inmunoprecipitación para verificar la expresión de la proteína transfectada en la célula.

3.11. DETECCIÓN DE GPIIb Y GPIIIa EN CÉLULAS TRANSFECTADAS

3.11.1. Citometría de flujo

La expresión en superficie de GPIIIa o complejos GPIIb/IIIa en células CHO se determina por citometría de flujo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las plaquetas.

3.11.2. Marcaje con biotina e inmunoprecipitación de GPIIb y/o GPIIIa

Se analiza la expresión de GPIIb y GPIIIa en la superficie celular o en la totalidad de la célula (superficie e intracelular) inmunoprecipitando estas proteínas con anticuerpos específicos.

Las células transfectadas con GPIIIa y/o GPIIb silvestre o mutante se incubaron con D-Biotina-N-hidroxi-succinimidester (SIGMA) 2,5 mM, durante 30 min. a temperatura ambiente para marcar la porción extracelular de las proteínas de la membrana plasmática. Después de la incubación, las células son lavadas con PBS y lisadas con Tris-CIH 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Triton-X-100 al 1%, Tween-20 al 0,05%, azida sódica al 0,03% y PMSF 1 mM. El material insoluble fue precipitado por centrifugación y el sobrenadante preincubado con 50 μ l de proteína A-Sepharosa al 50% con el fin de eliminar proteínas inespecíficas. Tras centrifugar de nuevo, el sobrenadante se incubó con anticuerpos anti-GPIIIa (P37) o anti-GPIIb (M3, M5) a 4°C. Los inmunocomplejos se precipitan mediante la incubación con proteína A-Sepharosa CL-4B (Pharmacia) a 4 °C durante 2 h. y después son lavados cinco veces por centrifugación y eluidos de la Sepharosa calentando a 100 °C durante 10 minutos con 50 μ l de Tris-CIH 0,1 M (pH 6,8), glicerol al 12%, β -mercaptoetanol al 1,5%, SDS al 3,5% y azul de bromofenol al 0,003%. Las proteínas inmunoprecipitadas se someten a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa que después de ser bloqueada con leche desnatada en polvo al 10% en PBS, se incuba con avidina-peroxidasa (dilución 1:3.000, BioRad) durante 1 h. a temperatura ambiente. Las proteínas de superficie biotiniladas se detectan con H₂O₂ al 0,015% y 0,5 mg/ml de 4-Cloro-1-Naftol en TBS.

Para el análisis del contenido total de GPIIb/IIIa, el marcaje con biotina se hizo usando lisados celulares totales, bien de células transfectadas o plaquetas, y el resto del procesamiento es idéntico al anteriormente descrito.

3.12. ANÁLISIS DE PULSO Y CAZA PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE COMPLEJOS GPIIb/GPIIIa MUTANTES

Para el estudio de la síntesis y estabilidad de los complejos GPIIb/IIIa mutantes, se realizó marcaje metabólico con metionina radiactiva en células CHO que expresan GPIIIa y GPIIb normal o mutante. Las células se incuban primero 30 min. en un medio DMEM sin metionina y después, se les añade [³⁵S]-metionina durante un pulso de otros 30 min. Tras sucesivos lavados con un tampón PBS que contiene 1 mg/ml de L-metionina no marcada, las células se incuban durante 0, 0,5, 2 o 4 horas en medio suplementado con metionina no radiactiva. Transcurridos estos tiempos, el medio se

retira y las células se lavan repetidas veces antes de añadir tampón de lisis. Las glucoproteínas GPIIb y GPIIIa de estos lisados se inmunoprecipitan como se ha descrito anteriormente, se resuelven mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5%, que una vez secos se exponen con una película autoradiográfica a temperatura ambiente.

3.13. DETECCIÓN DE PROTEÍNA CHAPERONA (BiP) ASOCIADA A GPIIb Y/O GPIIIa

Para examinar la asociación de GPIIb y/o GPIIIa con la proteína chaperona BiP ("Binding Protein"), los lisados de células CHO transfectadas se inmunoprecipitan con anti-GPIIb o anti-GPIIIa, pero la lisis e inmunoprecipitación se realiza en presencia de 10U/ml de apirasa (SIGMA), para evitar la disociación de BiP de sus proteínas sustrato. Los inmunoprecipitados se someten a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (7,5%) en condiciones reductoras y se transfieren a membranas de nitrocelulosa. La membrana se incuba durante 16 h. con un anticuerpo policlonal de conejo anti-BiP de hámster (L. Hendershot, St.Jude's Research Hospital, Memphis, USA) y posteriormente con una dilución 1/5.000 de inmunoglobulina G anti-conejo marcada con peroxidasa (SIGMA). Los inmunocomplejos se revelan con H₂O₂ y 4-Cloro-1-naftol.

3.14. INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MEGACARIOBLÁSTICA HUMANA MEG-01

Las células MEG-01, procedentes de un caso de leucemia humana (Ogura *et al*, 1985), crecen en suspensión en medio RPMI-1640, con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina y antibióticos, a 37 °C con atmósfera de 5% de CO₂. Se cambia el medio cada 2-3 días, manteniendo una densidad de 2-8 x 10⁶ células/ml. Las células son tratadas con concentraciones que van desde 0,5 nM hasta 150 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), durante períodos de tiempo variables para analizar la diferenciación megacariocítica. Las células presentan cierta tendencia a adherirse a las paredes de los frascos de cultivo y al tratarlas con PMA aumenta este porcentaje. Por ello, para su análisis, primero se recogen las células en suspensión y posteriormente las adheridas se despegan con PBS-EDTA 0,5 mM. El grado de diferenciación fue

valorado determinando la expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa mediante citometría de flujo. Para conocer la viabilidad celular tras el tratamiento con PMA, las células son tratadas con yoduro de propidio (50 µg/ml) antes de su análisis citométrico. También se extrajo el RNA total para cuantificar por RT-PCR los efectos de ésteres de forbol sobre los niveles de RNAm de GPIIb y GPIIIa.

3.15. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE FIBRINÓGENO EN PLAQUETAS

3.15.1. Marcaje de fibrinógeno con fluoresceína

La reacción de marcaje se realiza incubando 4 mg de fibrinógeno humano (SIGMA) con 2 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC)-Celite10% (Calbiochem) en 2 ml de PBS, a pH 8.3-8.5, durante 1 hora a temperatura ambiente (Xia *et al*, 1996). Una vez finalizado el marcaje del fibrinógeno, el FITC-Celite se elimina por centrifugación a 10.000 x g, 5 min. El fibrinógeno marcado con fluoresceína se separa del FITC libre pasando la muestra por una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) y con diálisis intensiva a 4 °C durante 24 horas. La eficacia del marcaje se determina por la relación Fluoresceína:Proteína (F:P) que se calcula midiendo la absorbancia del Fibrinógeno-FITC a 495 nm y 280 nm respectivamente.

3.15.2. Unión del fibrinógeno o PAC-1 a plaquetas activadas

La sangre completa es recogida en 1/10 de volumen de 3,8% citrato sódico y el plasma rico en plaquetas (PRP) es obtenido por centrifugación a 180 x g, 20 min. a temperatura ambiente. El PRP se centrifuga a 800 x g, 10 min. y las plaquetas sedimentadas se resuspenden en tampón Tyrode's, pH 7,4 (Hepes 5 mM, MgCl₂ 2 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, KCl 3 mM, NaCl 134 mM, NaHCO₃ 12 mM, 0,1% glucosa, 0,1% albúmina de suero bovino y CaCl₂ 1 mM) a una concentración final de 4 x 10⁷ plaquetas/ml. Una vez resuspendidas, se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 30 min. Las plaquetas (50 µl) serán estimuladas durante 5 min. con uno o más de los siguientes agentes activadores: ditiotreititol 20 mM (DTT), forbol 12-miristato 13-acetato 20 nM (PMA), adenosina 5'-difosfato 200 µM (ADP), (-)epinefrina 1 mM, 1,5 U/ml de trombina de plasma humano, péptido agonista del receptor de trombina 100 µM (TRAP; SFLLRN), factor activador de plaquetas-16 2 µM (PAF-16).

Posteriormente se adicionan 15 μg de fibrinógeno marcado con fluoresceína y se incuba durante otros 15 min. Tras un lavado, la cantidad de fibrinógeno-FITC ligado al complejo GPIIb/IIIa de las plaquetas activadas se determinará por citometría de flujo.

En plaquetas tratadas con PMA también se midió la unión de PAC-1-FITC, anticuerpo monoclonal ligando-mimético que sólo reconoce el heterodímero GPIIb/IIIa en su conformación activada, es decir, capaz de ligar fibrinógeno con alta afinidad (Shattil *et al*, 1985).

3.16. ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR A FIBRINÓGENO INMOVILIZADO

Los ensayos de adhesión se realizan en placas de 96 pocillos (Nalge Nunc) recubiertas con fibrinógeno de plasma humano (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) durante 2 horas a 37 °C y bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 1 h. antes de su uso.

Las células CHO transfectadas se despegan con PBS-EDTA y tras lavarlas con medio DMEM sin suero se resuspenden a una concentración de $5 \times 10^5/\text{ml}$. De esta suspensión celular se adicionan 100 μl a cada pocillo y se incuban durante distintos tiempos a 37 °C con 5% CO_2 . Las células no adheridas se retiran con sucesivos lavados y las adheridas se visualizan y fotografían con un microscopio de contraste de fase (Nikon).

3.17. ENSAYOS DE AGREGACIÓN EN PRESENCIA DE FIBRINÓGENO CON CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS

La agregación espontánea de células CHO transfectadas con los cDNAs de GPIIb y GPIIIa normal o mutado se analiza a partir de una suspensión celular ($1,6 \times 10^6/\text{ml}$ de medio sin suero) que se incuba con o sin fibrinógeno (1 mg/ml) en placas de cultivo de 24 pocillos (FALCON), previamente bloqueadas con BSA al 1%. Después de 15 min. a temperatura ambiente, se analiza la presencia de agregados mediante microscopía. En algunos casos, las células se preincuban con anti-GPIIIa (10 μg de P37) o EDTA 10mM durante 10 min. antes de la adición de fibrinógeno.

4- RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. PATOLOGÍAS MOLECULARES ASOCIADAS A FENOTIPOS TROMBOASTÉNICOS TIPO II

4.1.1. MUTACIÓN Cys⁶⁷⁴→Arg EN EL EXÓN 21 DE GPIIb

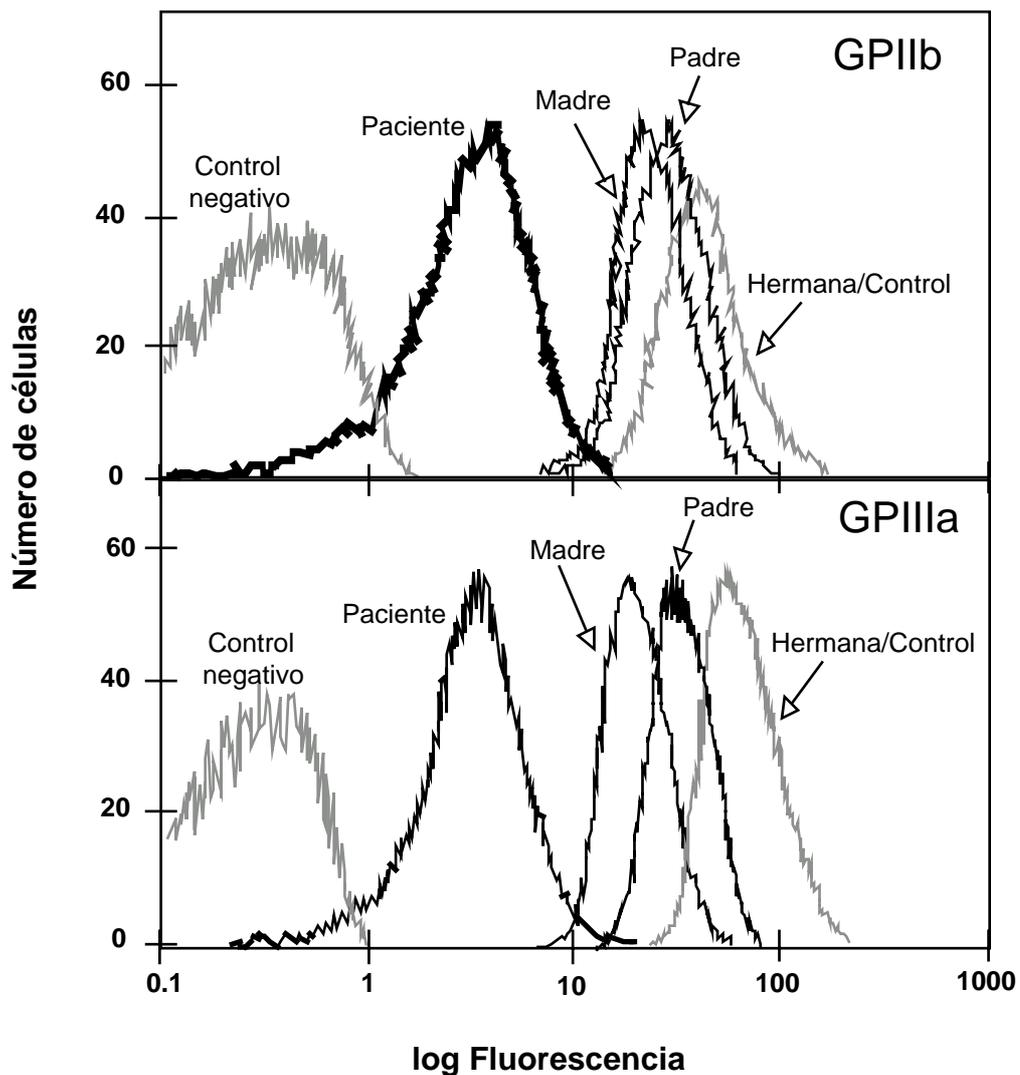
4.1.1.1. Datos clínicos

La paciente es una niña de 11 años que refiere frecuentes hemorragias mucocutáneas y aparición de petequias y hematomas sin causa aparente desde el nacimiento. Los padres, clínicamente asintomáticos, no reconocieron consanguinidad ni diátesis hemorrágica en la familia. En el momento de la recepción de muestras para su estudio, la paciente mostraba un tiempo de coagulación prolongado (7 min.), plaquetas de forma, tamaño y número normales (286.000/ μ l) y falta de agregación plaquetaria tanto espontánea como en respuesta a ADP, epinefrina o colágeno, aunque normal en respuesta a ristocetina. Los padres también mostraron disminución de agregación plaquetaria en respuesta a ADP o epinefrina y normal a ristocetina. En base a los datos clínicos y analíticos, la paciente fue diagnosticada de tromboastenia de Glanzmann.

4.1.1.2. Contenido de GPIIb y GPIIIa en plaquetas

La expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa en plaquetas se analizó por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen cada una de las subunidades. Los histogramas de la figura 8 representan las intensidades de fluorescencia obtenidas en plaquetas del paciente y sus familiares. La paciente mostró una importante reducción de los niveles de GPIIb y GPIIIa, con un canal medio de fluorescencia de aproximadamente un 10% de los valores obtenidos en individuos control. Ambos progenitores presentaron niveles de GPIIb/IIIa inferiores al control, disminución notablemente más acusada en el caso de la madre, mientras que las plaquetas de la hermana mostraron valores similares al control. Los resultados obtenidos en ensayo de inmunofluorescencia y análisis de western a partir de plaquetas confirmaron los datos obtenidos por citometría de flujo (Tabla VII). En contraste con otros pacientes tromboasténicos con ausencia total de GPIIb/IIIa en los que el

Figura 8

EXPRESIÓN DE COMPLEJOS GPIIb/IIIa EN LA SUPERFICIE DE LAS PLAQUETAS DEL PACIENTE Y FAMILIARES

Plaquetas lavadas son incubadas con anticuerpos específicos, antiGPIIb y antiGPIIIa, como se describe en el apartado de Métodos. Los resultados se expresan como el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de células. El panel superior muestra la expresión de GPIIb en plaquetas del paciente, sus padres, una hermana y un control. El panel inferior representa la expresión de GPIIIa en las plaquetas de estos mismos individuos. El control negativo indica la fluorescencia medida en plaquetas tratadas solamente con el anticuerpo secundario.

Tabla VII
Cuantificación de GPIIb, GPIIIa y fibrinógeno en las plaquetas del paciente y familiares

	Paciente	Padre	Madre	Hermana	Control
<u>Citometría de flujo</u>					
(canal medio de fluorescencia)					
GPIIb	4,2	25	15	52	45
GPIIIa	4	30	17	45	50
<u>Enzimoimmunoensayo</u>					
(% del control)					
GPIIb	10	50	25	100	100
GPIIIa	10	58	30	100	100
Fibrinógeno	25	100	100	100	100
<u>Western</u>					
(% del control)					
GPIIb	10	45	35	89	100
GPIIIa	12	62	41	105	100

La citometría de flujo, el enzimoimmunoensayo y el análisis de inmunotransferencia se realiza como se describe en el apartado de Métodos, utilizando anticuerpos específicos. Los valores de citometría son la media de tres observaciones distintas en duplicado. Los valores del control son las medias de al menos cuatro diferentes individuos sanos. La inmunotransferencia de lisados totales de plaquetas se realizó con dos diluciones distintas y en duplicado. La densitometría de las bandas se analiza con el programa NIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Los valores son expresados como porcentajes del control.

contenido plaquetario de fibrinógeno es prácticamente indetectable, la paciente mostró un 25% de los valores obtenidos en plaqueta control (Tabla VII).

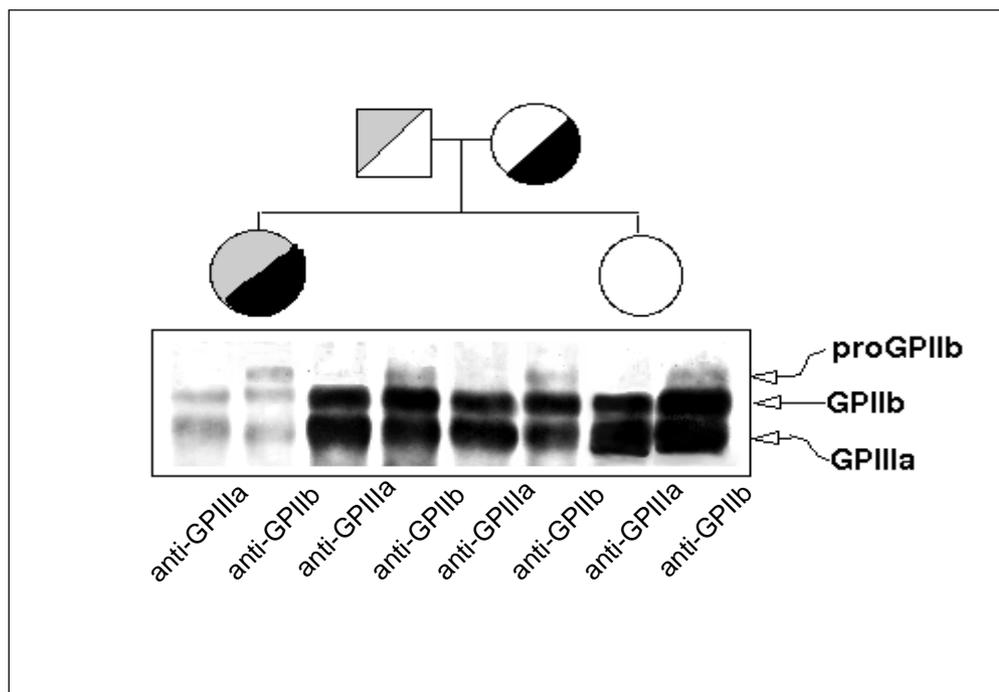
Para verificar la movilidad electroforética de GPIIb y GPIIIa y su grado de heterodimerización, se realizó un análisis de inmunoprecipitación a partir de lisados de plaquetas utilizando anticuerpos anti-GPIIb y anti-GPIIIa (Figura 9). Con ambos anticuerpos se obtienen bandas que migran como GPIIb y GPIIIa y sólo con anti-GPIIb se inmunoprecipita una banda cuyo tamaño aparente corresponde a proGPIIb. En los lisados de plaquetas del enfermo, la densidad de las bandas de GPIIb y GPIIIa es menor aunque la relación de densidades proGPIIb/GPIIb madura es mucho mayor que la obtenida en sus familiares. Los padres muestran un patrón de bandas similar aunque menos intenso al obtenido en el caso de la hermana, cuyo contenido de GPIIb/IIIa es normal.

4.1.1.3. Identificación de mutaciones en GPIIb

Para determinar la lesión molecular que da lugar al déficit de receptor de fibrinógeno en esta paciente, se procedió a un análisis estructural de los genes de GPIIb y GPIIIa mediante SSCP y secuenciación. Cada uno de los exones y regiones intrónicas adyacentes se estudiaron por el análisis del polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (SSCP). Así se vio que el fragmento de DNA genómico amplificado por PCR, que comprende los exones 5 a 7 de GPIIb presentaba, en la paciente y en el padre, un patrón de bandas con movilidades diferentes a los controles (Figura 10A). La secuenciación de esta región (Figura 10C) mostró la existencia de una transversión heterocigota C→A en la posición +2 del extremo 5' del intrón 5 de GPIIb. Esta base forma parte de la secuencia consenso del sitio de reconocimiento para el "splicing" de dicho intrón. La consecuencia predecible de la mutación [IVS5(+2)C→A] es que altere el procesamiento del RNA, dando lugar a la incorporación del intrón 5 (76 pb) en el RNAm, desplazamiento del marco de lectura y aparición de un codón de terminación prematuro. Esta mutación heterocigota, fue también hallada en el DNA genómico del padre, pero no en la madre ni en la hermana de la paciente.

El análisis de SSCP del exón 21 de GPIIb mostró un patrón anómalo (Fig. 10B) de bandas en la paciente y en su madre, mientras que el del padre y hermana eran idénticos al control. Como muestra la figura 10D, por secuenciación se identificó una

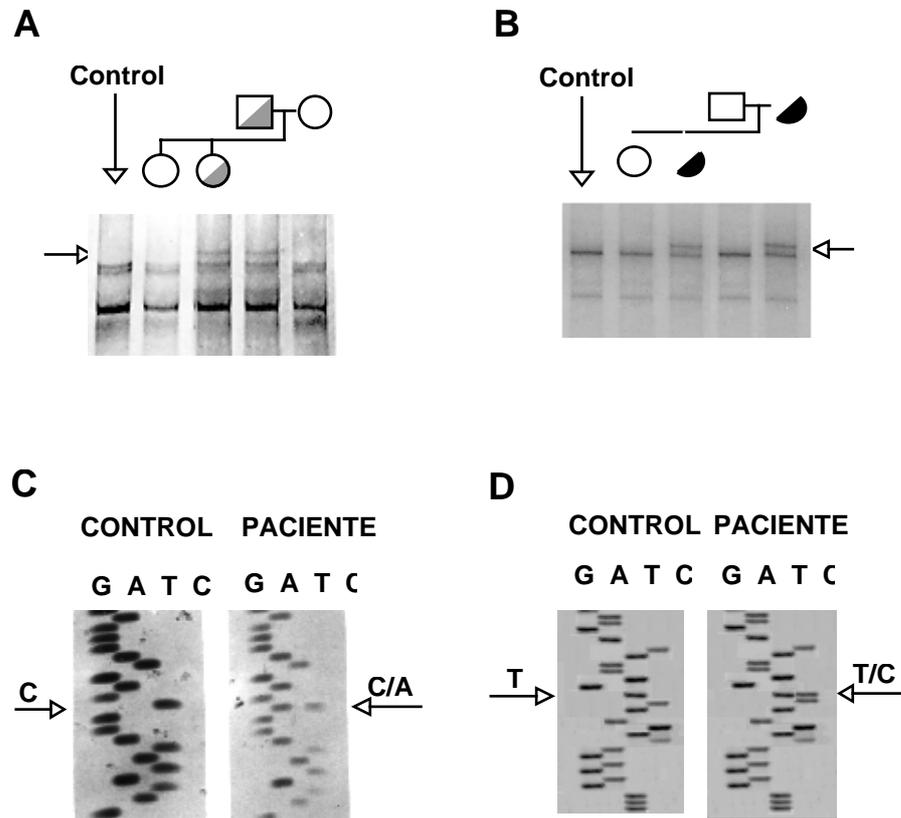
Figura 9

**ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE GPIIb Y GPIIIa DE
PLAQUETAS DEL PACIENTE Y FAMILIARES**

Las proteínas de los lisados de plaquetas del paciente y familiares son marcadas con biotina y los complejos GPIIb/IIIa son inmunoprecipitados con anticuerpos específicos. El material precipitado se resuelve en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y se transfiere a membranas de nitrocelulosa que son procesadas como se indica en Materiales y Métodos.

Figura 10

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GPIIb A PARTIR DE DNA GENÓMICO DEL PACIENTE



(A) Un fragmento de DNA genómico de 442 pb que comprende los exones 5, 6 y 7 de GPIIb fue amplificado por PCR, digerido con TaqI, y analizado mediante SSCP en geles de acrilamida al 16% - glicerol 8,7% a 14 °C. (B) Un fragmento de DNA genómico de 193 pb que contiene el exón 21 de GPIIb fue analizado por SSCP en geles de acrilamida al 14% - glicerol 8,7% a 15 °C. Las flechas señalan las bandas que en el paciente y los progenitores son distintas a las encontradas en el control. (C) y (D) muestran un fragmento de la secuenciación donde se identificó la transversión heterocigota C→A en la posición +2 del intrón 5 de GPIIb (C) y la transición T→C en el exón 21 de GPIIb en el paciente (D).

nueva mutación heterocigota (alelo materno) en el exón 21 de GPIIb. En este caso, se produce una transición de T por C en la posición 2113 del cDNA, que provoca la sustitución del residuo de cisteína 674 por una arginina (C674R) en la subunidad GPIIb. Esta mutación provoca la aparición de un nuevo sitio de restricción Fok I en la posición 2109 del cDNA, lo cual permitió verificar la presencia o ausencia de esta mutación en otros miembros de la familia. Ninguna de estas mutaciones fue encontrada en el DNA genómico de un gran número de individuos control, lo que parecía indicar que dichas mutaciones podrían ser responsables de fenotipo tromboasténico de la paciente

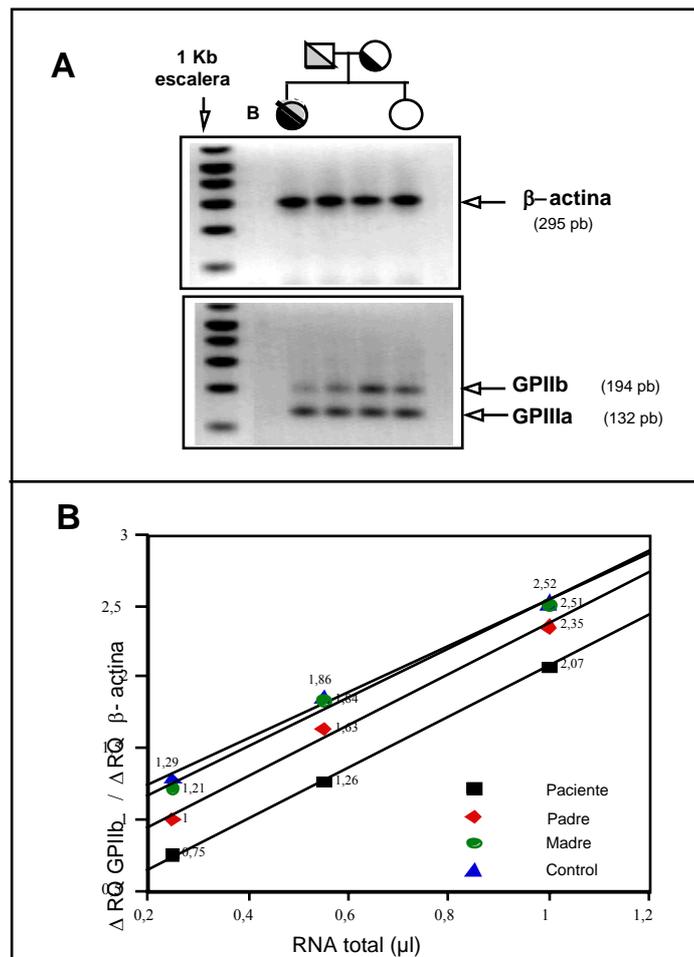
4.1.1.4. Cuantificación y análisis del RNA mensajero de GPIIb y GPIIIa en plaquetas

A partir de RNA total de plaquetas del paciente, familia y controles, se determinaron los niveles de RNAs mensajeros de GPIIb, GPIIIa y β -actina mediante RT-PCR, con sondas fluorescentes específicas para cada caso, según el procedimiento TaqMan descrito en el apartado de Métodos. La reacción se llevo a cabo en unas condiciones predeterminadas de cantidad de RNA y número de ciclos que aseguran que la emisión de fluorescencia de la sonda sea proporcional al producto generado por PCR. En este caso, se usaron 3 diferentes diluciones de las preparaciones de RNA total obtenidas de plaquetas del paciente, sus padres y un individuo control. Los productos de PCR obtenidos para una de las concentraciones de RNA utilizadas y sometidos a electroforesis en geles de agarosa, se muestran en la figura 11A. La emisión de fluorescencia debida a la hidrólisis de las sondas TaqMan específicas, se mide al final de la reacción. Los valores obtenidos para GPIIb y GPIIIa se normalizan con los obtenidos para la β -actina en cada una de las muestras. En la figura 11B se representan los valores del cociente $\Delta RQ \text{ GPIIb} / \Delta RQ \beta\text{-actina}$ frente a la cantidad de RNA total utilizado en la reacción. La relación GPIIIa/ β -actina obtenida en todos los miembros de la familia fue similar a la observada en el control. En contraste, los valores de GPIIb/ β -actina del padre y enferma muestran una reducción significativa, expresando solamente un 67% y 52% del control, respectivamente. En la madre, los niveles de RNA mensajero de GPIIb fueron normales.

De los resultados obtenidos en la cuantificación del RNAm de GPIIb se puede deducir que la mutación IVS5(+2)C→A, encontrada en estado heterocigótico en padre

Figura 11

CUANTIFICACIÓN DEL RNAm DE GPIIb Y GPIIIa DE PLAQUETAS DE LA FAMILIA CON MUTACIONES [IVS5(+2)C→A] Y Cys⁶⁷⁴→Arg EN GPIIb



A partir de RNA total de plaquetas del paciente, familia y controles, se determinaron los niveles de RNAm de GPIIb, GPIIIa y β -actina mediante RT-PCR, adicionando sondas fluorescentes específicas (TaqMan, Perkin-Elmer) como se describe en el apartado de Métodos. (A) Los productos de PCR obtenidos para una de las concentraciones de RNA utilizadas, son sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 3% y visualizados por tratamiento con bromuro de etidio. (B) El incremento de emisión de fluorescencia (ΔRQ) de las sondas específicas TaqMan se mide al final de la reacción y los valores obtenidos para GPIIb y GPIIIa se normalizan con los de la β -actina en cada una de las muestras. En este panel se representan los valores del cociente $\Delta RQ \text{ GPIIb} / \Delta RQ \beta\text{-actina}$ frente a la cantidad de RNA total utilizado como templado de la reacción.

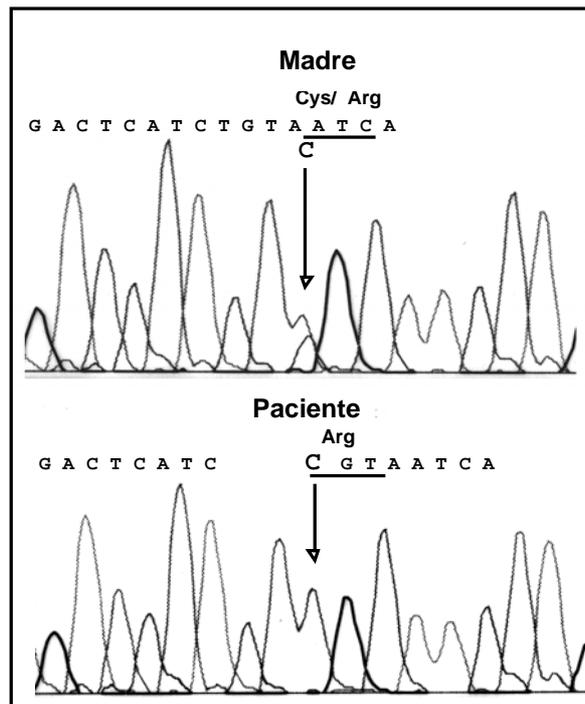
y paciente, provoca una clara disminución en los niveles de mensajero, mientras que la mutación T²¹¹³→C presente en la madre no altera la tasa normal de transcripción de GPIIb. De todos modos, para determinar el origen alélico de los transcritos de GPIIb en la paciente, se amplificó por RT-PCR un fragmento de 1190 pb que comprende los exones 20 a 30 de GPIIb y se secuenció directamente con un secuenciador automático. La figura 12 muestra que la paciente sólo posee una citidina en el nucleótido de la posición 2113, mientras que en la madre, heterocigota para la transición T²¹¹³→C, se obtuvo tanto una citidina como una timidina en esta misma posición. Según estas observaciones, el RNAm de GPIIb en la paciente proviene exclusivamente del alelo materno portador de la sustitución T²¹¹³→C.

4.1.1.5. Expresión heteróloga de las formas normal y mutante de GPIIb en células de mamífero

Para investigar el efecto de la mutación Cys⁶⁷⁴→Arg de GPIIb en la síntesis y expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa, se realizaron transfecciones transitorias en células CHO con el plásmido de expresión pcDNA3 conteniendo el cDNA de GPIIIa o GPIIb normal o mutante. Las proteínas de membrana de las células transfectadas se marcan con biotina y los complejos GPIIb/IIIa se inmunoprecipitan con anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las subunidades. En las células cotransfectadas con GPIIIa y GPIIb normal, se detectó la presencia en membrana de ambas subunidades formando heterodímeros, pues las bandas correspondientes a ambas glucoproteínas se inmunoprecipitaron tanto con anti-GPIIb como anti-GPIIIa. Sin embargo, en las células transfectadas con GPIIIa y GPIIb mutante la expresión de los complejos en la superficie celular estaba claramente disminuida (Fig. 13A).

Para detectar también el contenido intracelular de GPIIb/IIIa, se marcaron con biotina las proteínas de lisados celulares totales antes de la inmunoprecipitación. El patrón de bandas obtenido para las células que coexpresan ambas subunidades normales fue similar al mostrado en la superficie celular, a excepción de una banda correspondiente a proGPIIb que es observada cuando la inmunoprecipitación se realiza con anti-GPIIb (Fig. 13B). En la inmunoprecipitación con anti-GPIIb de lisados de células que coexpresan GPIIIa y GPIIb mutante, se detectó la presencia de proGPIIb además de bandas más tenues que migran como GPIIb madura y GPIIIa.

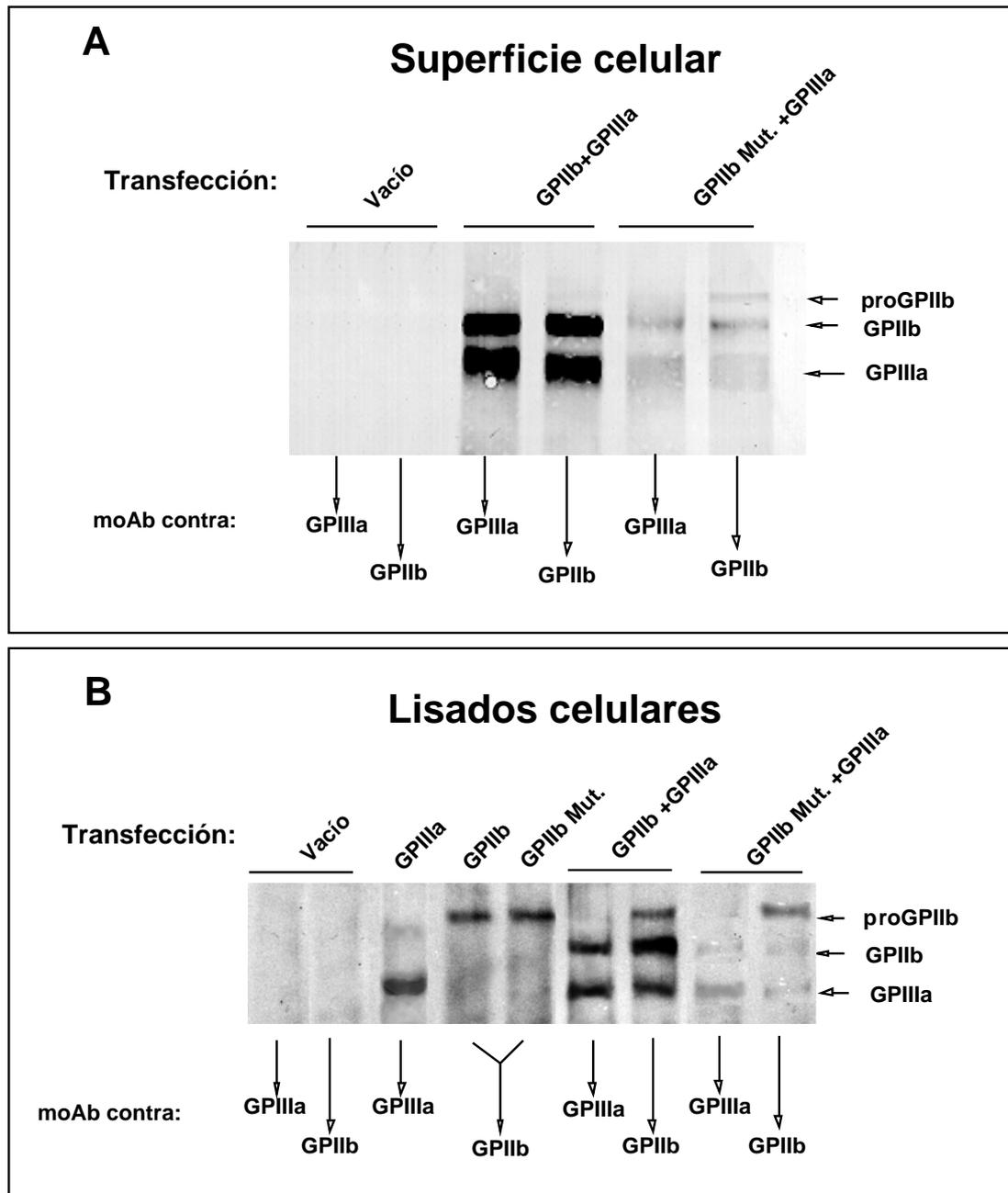
Figura 12

ANÁLISIS DEL RNAm DE GPIIb DE LAS PLAQUETAS DEL PACIENTE Y LA MADRE CON LA MUTACIÓN Cys⁶⁷⁴→Arg

Un fragmento de 1190 pb que contiene desde el exón 20 al 30 de GPIIb se amplificó por RT-PCR a partir de RNA total de plaquetas del paciente y de la madre utilizando los oligonucleótidos Iib1965-S21 y Iib3154-A21. Los productos amplificados fueron secuenciados directamente con un secuenciador automático modelo ABIprism 377 (Perkin-Elmer).

Figura 13

ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE COMPLEJOS GPIIb/IIIa DE
CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS CON [674R]GPIIb



Células CHO son transfectadas transitoriamente con los cDNAs de GPIIIa y/o GPIIb normal o mutante [674R]. Las proteínas de la superficie celular (A) o las totales (B) son marcadas con biotina y los complejos GPIIb/IIIa son inmunoprecipitados con anticuerpos monoclonales anti-GPIIb o anti-GPIIIa. Las proteínas inmunoprecipitadas se someten a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa que se incuba con avidina-peroxidasa antes de ser revelada con H_2O_2 y 4-Cloro-1-Naftol.

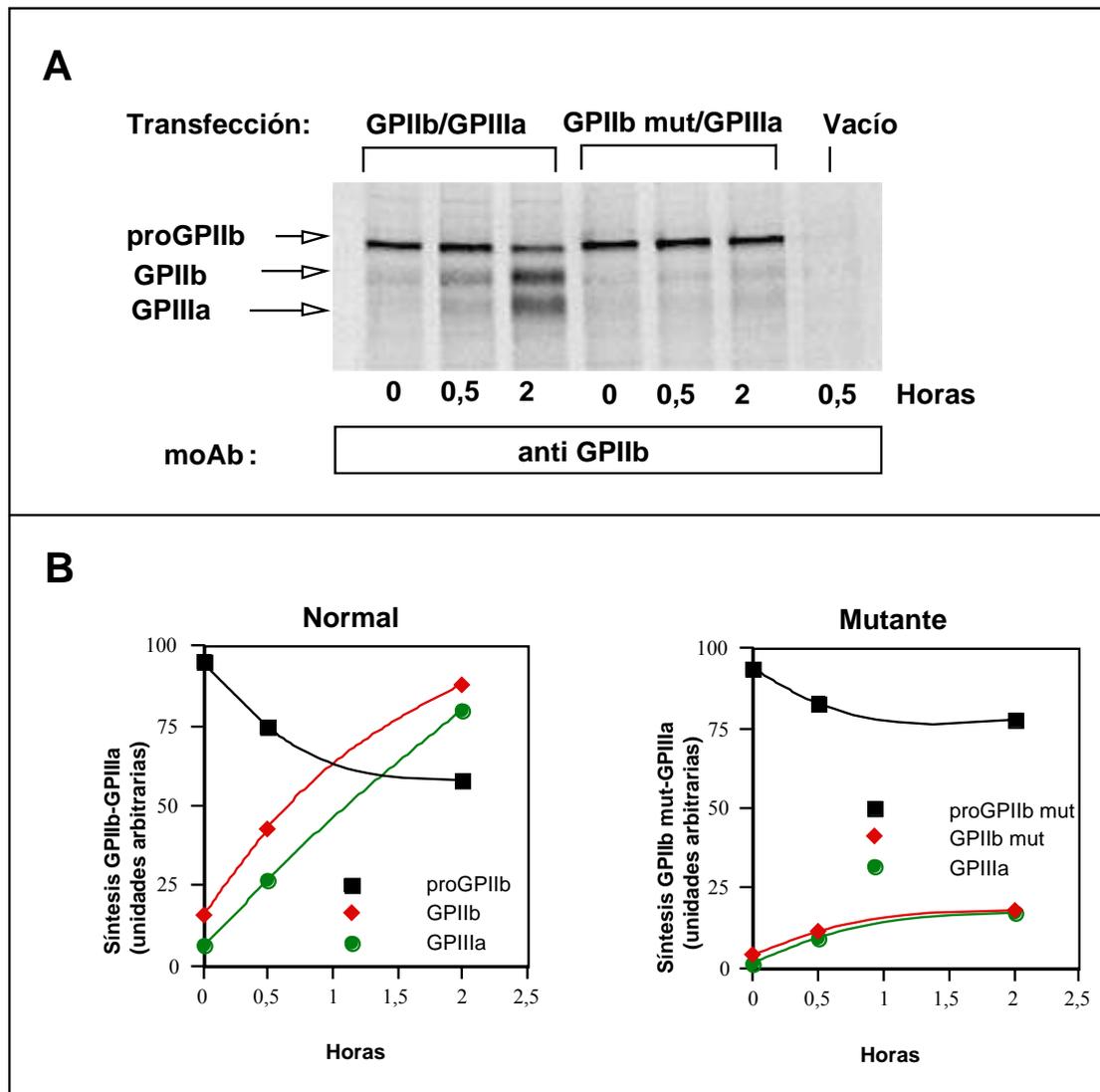
Cuando la inmunoprecipitación se llevó a cabo con anti-GPIIIa, sólo se detectó GPIIIa y una banda poco visible correspondiente a GPIIb. Estas observaciones están de acuerdo con lo obtenido en el análisis de inmunoprecipitación a partir de lisados de plaquetas del paciente y parecen sugerir que la glucoproteína [674R]GPIIb mutante es capaz de heterodimerizar con GPIIIa pero posee una menor eficacia en el proceso de maduración y expresión en superficie.

4.1.1.6. Análisis de pulso y caza para el estudio de la estabilidad de los complejos [674R]GPIIb/IIIa

Las observaciones anteriores parecen indicar que la dimerización de la subunidad [674R]GPIIb no está impedida, por ello la razón de la baja tasa de expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa no se puede explicar a partir de los resultados obtenidos hasta el momento. En principio, se podría deber a una mayor inestabilidad de los complejos mutantes o debido a un retardo o impedimento a lo largo del tránsito intracelular en su ruta de biosíntesis. Para investigar este punto, células cotransfectadas transitoriamente con GPIIIa y GPIIb normal o [674R]GPIIb, fueron incubadas con [³⁵S]-metionina durante 30 minutos. Al finalizar la incubación se retira el precursor radiactivo y las células se incuban con un exceso de metionina no marcada durante 0, 0,5 o 2 horas antes de que sean lisadas e inmunoprecipitadas con anti-GPIIb. Como se puede apreciar en la figura 14, en las células transfectadas con GPIIIa y GPIIb normal la cantidad de proGPIIb marcada decrece a lo largo del tiempo del mismo modo en que aumentan los niveles de complejos GPIIb/IIIa. Esto refleja un procesamiento, transporte y estabilidad normal de GPIIb/IIIa en estas células. Cuando se cotransfectan GPIIIa y [674R]GPIIb mutante, también se inmunoprecipitan las subunidades proGPIIb, GPIIb y GPIIIa con el anticuerpo anti-GPIIb en los tiempos analizados, pero en este caso, la disminución del marcaje de proGPIIb con el tiempo es mucho más lenta, sugiriendo que el número de subunidades que continúan la ruta de biosíntesis a lo largo del aparato de Golgi hasta llegar a la membrana es mucho menor. Después de 2 horas, el patrón de marcaje en células que expresan [674R]GPIIb fue similar al observado en las células control a tiempo cero. De acuerdo con estos resultados, la mutación C674R de GPIIb cambia la cinética o impone un nuevo paso limitante en el procesamiento del complejo GPIIb/IIIa.

Figura 14

ANÁLISIS DE PULSO Y CAZA DE LA SÍNTESIS Y ESTABILIDAD DE COMPLEJOS [674R]GPIIb /IIIa



(A) Células CHO, cotransfectadas transitoriamente con GPIIIa y [674R]GPIIb o GPIIb normal, son marcadas con [35 S]-metionina durante un pulso de 30 minutos y después incubadas con un exceso de metionina no marcada. En los tiempos indicados, las células son lisadas e inmunoprecipitadas con anti-GPIIb. Los precipitados se analizan mediante electroforesis como se describe en la sección de Métodos. (B) La intensidad de las bandas correspondientes a proGPIIb, GPIIb y GPIIIa, se cuantifica por densitometría digitalizando primero las bandas con un scanner de alta resolución y analizándolas después con el programa NIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Las gráficas de este panel representan los valores obtenidos para cada una de las bandas frente a los distintos tiempos.

4.1.1.7. Asociación de la proteína chaperona BiP a la subunidad GPIIb mutante

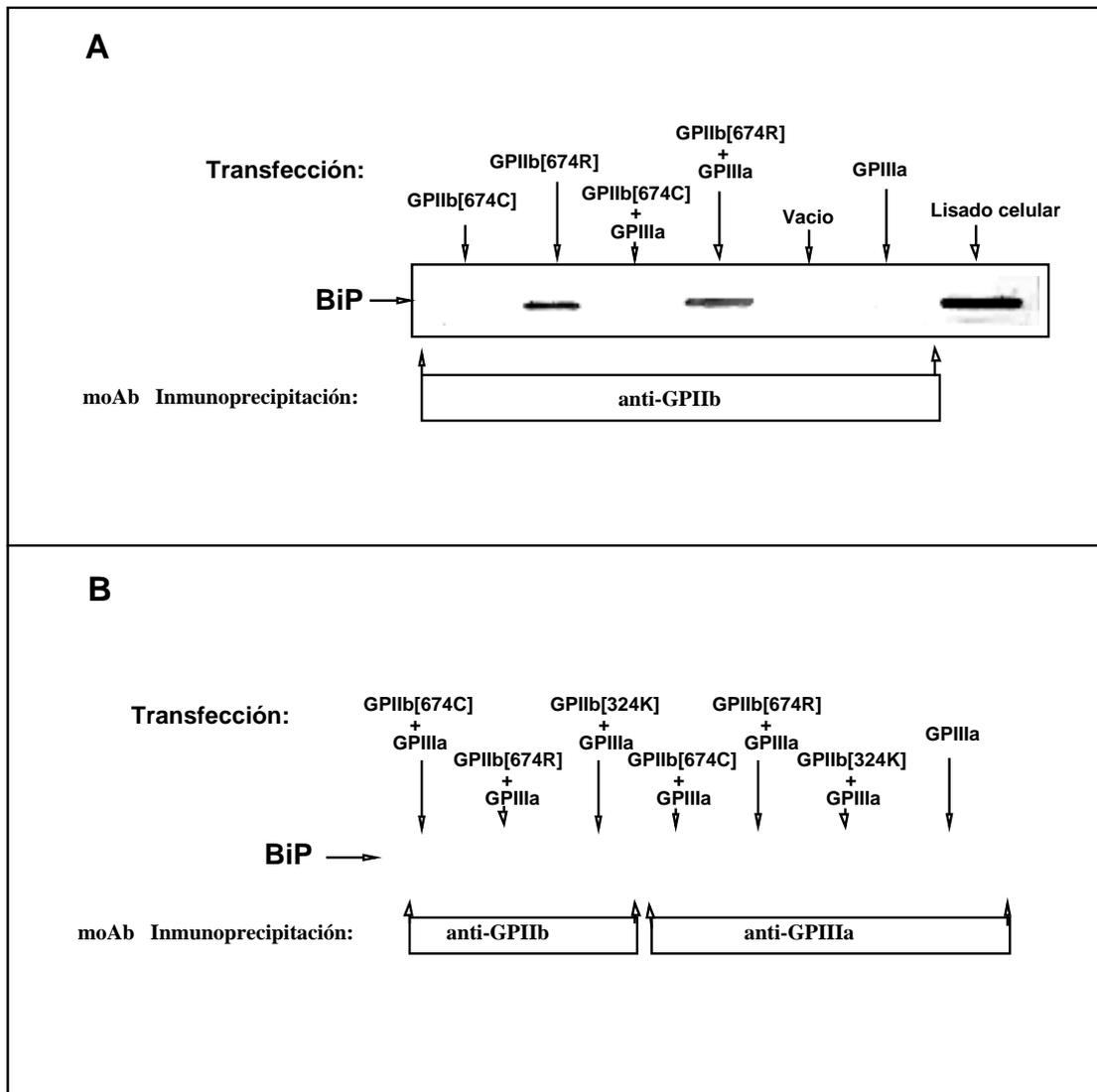
El análisis de pulso y caza parece indicar que una etapa inicial de la ruta de expresión en superficie de [674R]GPIIb/IIIa debe estar alterada. Como la sustitución de la cisteína 674 de GPIIb implica la ruptura de un puente disulfuro intramolecular y por tanto, un cambio conformacional, nos pareció interesante el estudio de la interacción de GPIIb normal y mutante con la proteína chaperona BiP (Hendershot *et al*, 1988). La proteína BiP (GRP78) es un miembro de la familia hsp70 de chaperonas intracelulares que reside en el lumen del retículo endoplasmático donde se une transitoriamente a las proteínas nacientes, ayudando a su plegamiento y ensamblaje, pero la unión a proteínas con una conformación incorrecta será más estable, contribuyendo así a su retención y degradación en el retículo (Hellman *et al*, 1999). Con este fin, lisados totales de células CHO coexpresando GPIIIa y GPIIb normal o mutante o expresando solamente una de las subunidades, se inmunoprecipitan con anti-GPIIb y los precipitados se analizan por western utilizando un anticuerpo policlonal contra la chaperona BiP de hámster. Como se muestra en la figura 15A, la chaperona BiP únicamente se detectó en las células transfectadas con la subunidad [674R]GPIIb mutante sola o cotransfectada con GPIIIa. Para determinar si la proteína BiP inmunoprecipitada con anti-GPIIb estaba asociada sólo al monómero pro[674R]GPIIb o también cuando está formado complejos con GPIIIa, realizamos el mismo tipo de análisis pero inmunoprecipitando también con anti-GPIIIa, anticuerpo que reconoce los monómeros y heterodímeros de GPIIIa. Como se aprecia en la figura 15B, con anti-GPIIIa sólo fue posible inmunoprecipitar BiP en células que coexpresan GPIIIa y [674R]GPIIb, sugiriendo que BiP se encuentra asociada tanto a conformaciones anómalas de pro[674R]GPIIb monomérica como a complejos heterodiméricos mutantes. De acuerdo con esta interpretación, la figura 15B también muestra que en células CHO transfectadas con la mutación [324K]GPIIb, incapaz de heterodimerizar con GPIIIa, no pudo ser detectada BiP cuando se utilizó anti-GPIIIa para inmunoprecipitar.

4.1.1.8. Mutagénesis del puente disulfuro 674-687 de GPIIb

Para aclarar si los efectos causados por la mutación C674R de GPIIb son debidos a la desaparición del puente disulfuro intracatenario 674-687, a la necesidad de una cisteína (C) en la posición 674 o a la presencia de un aminoácido con carga positiva

Figura 15

ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA CHAPERONA BiP A LA SUBUNIDAD [674R]GPIIb



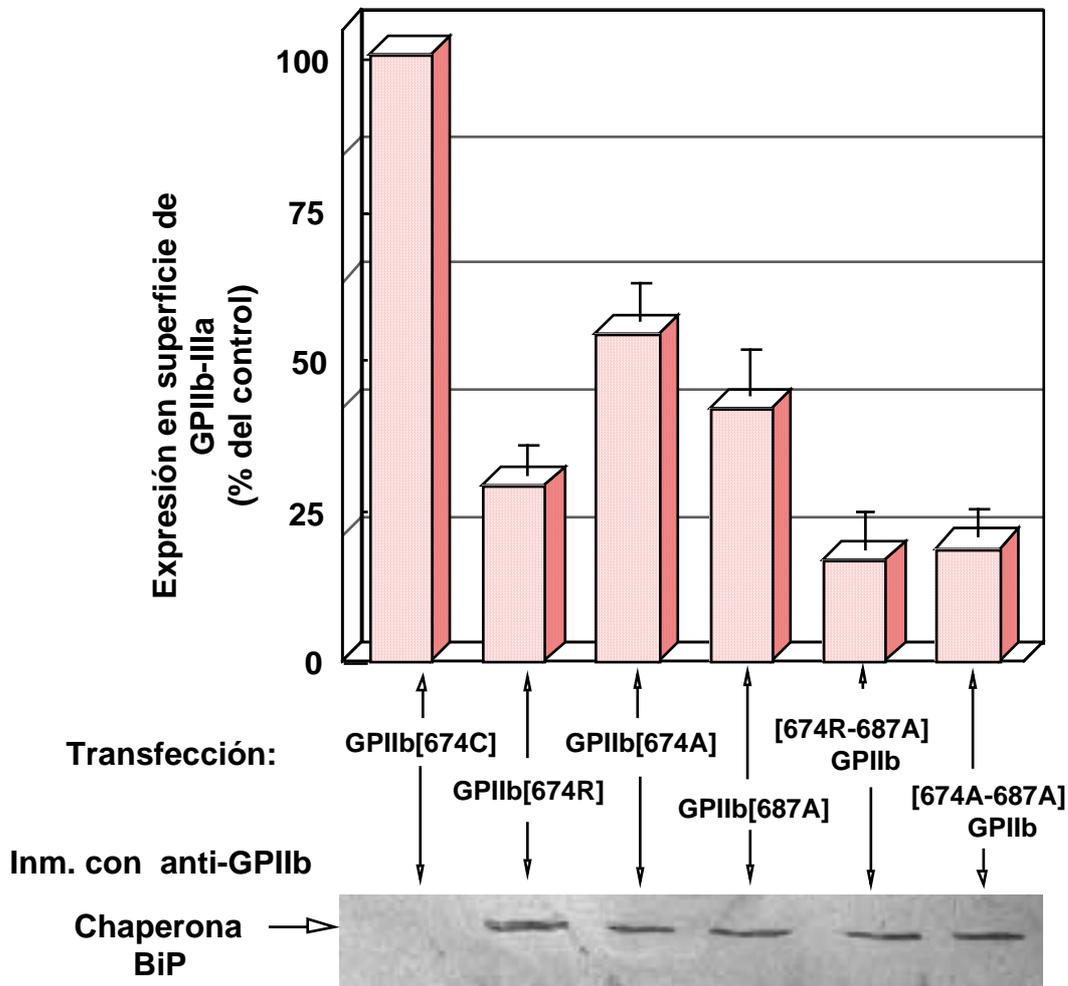
Células CHO, transfectadas transitoriamente con GPIIIa y/o GPIIb normal, [674R]GPIIb o [324K]GPIIb, se lisan e inmunoprecipitan solamente con anti-GPIIb (A) o se inmunoprecipitan con los anticuerpos monoclonales de cada subunidad, anti-GPIIb y anti-GPIIIa (B). Los precipitados se resuelven mediante electroforesis y se transfieren a una membrana que se incuba con un anticuerpo policlonal anti-BiP, como se describe en Materiales y Métodos.

(R) en este lugar, generamos mutaciones puntuales en los residuos de GPIIb implicados en este puente disulfuro, sustituyendo una o ambas cisteínas por alanina (A). Realizamos transfecciones transitorias de los distintos cDNAs mutados de GPIIb en células CHO-IIIa y analizamos los efectos producidos en cada caso sobre la expresión en superficie del receptor GPIIb/IIIa mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se representan en la figura 16. Al igual que en las plaquetas de la portadora de la mutación, la cantidad de [674R]GPIIb/IIIa que se detectó en la superficie de las células CHO fue menor (29%) que los valores control hallados en células transfectadas con GPIIb normal. La sustitución de la cisteína 674 por alanina, en vez de arginina, mejoró los niveles de expresión en superficie, llegando hasta un 55% del control, lo que sugiere que la presencia de un aminoácido cargado positivamente en esta posición no favorece la expresión de este complejo, aunque no es su presencia la única causa del déficit de expresión superficial. Para observar los cambios provocados por la ausencia del puente disulfuro intracatenario 674-687, se introdujo la mutación C687A, que cambia la otra cisteína del puente disulfuro por alanina. La expresión de la forma [687A]GPIIb también fue un 41% de la observada para GPIIb normal, por lo que parece lógico pensar que la conservación del puente disulfuro 674-687 de GPIIb es esencial para mantener niveles normales de expresión superficial de GPIIb/IIIa. Las formas de GPIIb con ambas cisteínas mutadas, 674R-687A y 674A-687A, sólo expresaron alrededor del 15-20% del control, lo cual indica, que además de la ruptura del puente disulfuro, la desaparición de ambas cisteínas provoca un efecto aún más negativo sobre la expresión de GPIIb/IIIa.

Lisados totales de las células transfectadas con cada forma mutante de GPIIb fueron inmunoprecipitados con anti-GPIIb y a continuación, se determinó la presencia de la chaperona BiP entre las proteínas precipitadas. Los resultados obtenidos (Figura 16, panel inferior) indicaron que BiP está fuertemente asociada no sólo a [674R]GPIIb, glucoproteína mutada de forma natural, sino también al resto de formas mutantes creadas en el laboratorio que afectan todas ellas a la expresión del complejo GPIIb/IIIa.

Figura 16

MUTAGÉNESIS DEL PUENTE DISULFURO 674-687 DE GPIIb



Células CHO-IIIa fueron transfectadas con el cDNA de GPIIb normal o el de las distintas formas mutantes de GPIIb que se indican. En el panel superior se representa la expresión en superficie de los complejos GPIIb/IIIa, determinada mediante citometría de flujo con anti-GPIIb. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes en duplicado y se indican como porcentaje de la expresión en superficie de los complejos normales ([674C]GPIIb/IIIa). En el panel inferior, lisados totales de las células transfectadas con cada forma mutante de GPIIb fueron inmunoprecipitados con anti-GPIIb y a continuación, se analizó la presencia de la chaperona BiP entre las proteínas precipitadas mediante inmunotransferencia de western con el anticuerpo policlonal anti-BiP.

4.1.1.9. Fijación de fibrinógeno y PAC-1 a plaquetas portadoras de complejos [674R]GPIIb/IIIa mutantes

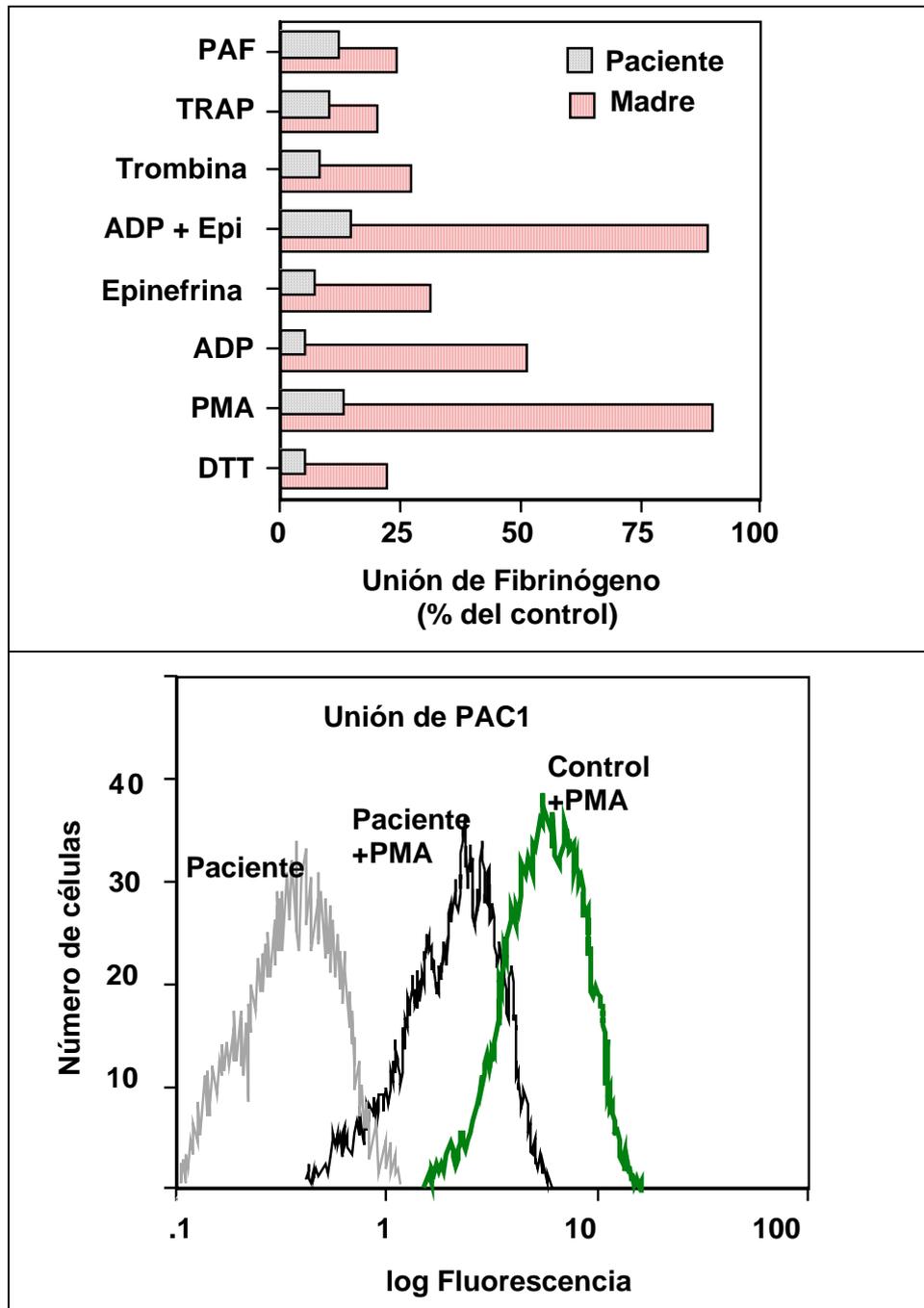
Como acabamos de describir, la mutación C674R de GPIIb provoca un defecto cuantitativo del receptor plaquetario GPIIb/IIIa, que justifica el fenotipo tromboasténico de la paciente, pero desconocemos si la presencia de una arginina en la posición 674 de GPIIb y la conservación del puente disulfuro 674-687 son importantes desde un punto de vista funcional. Con tal fin, hemos estudiado la fijación de ligandos a plaquetas de la paciente tromboasténica objeto de este estudio, que expresa sólo receptor [674R]GPIIb/IIIa (10% del control) y de su madre, heterocigota para la mutación [674R]GPIIb, que expresa sólo el 30% de receptor de plaquetas control. Para ello, analizamos la unión de fibrinógeno soluble a las plaquetas tras ser activadas con distintos agonistas fisiológicos o pretratadas con otros agentes activadores conocidos como DTT o PMA. El fibrinógeno fue marcado con fluoresceína para poder detectar su unión a las plaquetas mediante citometría de flujo. La unión del fibrinógeno a plaquetas de la paciente y de la madre se representa en la figura 17A como la intensidad de fluorescencia obtenida mediante citometría de flujo y expresada como porcentaje de los valores obtenidos en plaquetas control. En todos los casos, las plaquetas respondieron a diversos activadores produciéndose fijación de fibrinógeno soluble. Aunque el incremento de fluorescencia observado en paciente y madre fue inferior al obtenido en plaquetas de individuos control, hay que hacer notar que fue proporcional al número de receptores que poseen en la superficie plaquetaria. Según estos datos, la activación plaquetaria inducida por agonistas es capaz de producir un cambio conformacional en los complejos [674R]GPIIb/IIIa, cuyo resultado es un aumento de afinidad por el fibrinógeno en solución. Esta interpretación se ve corroborada por la observación de que las plaquetas de la paciente después de ser estimuladas con PMA, son reconocidas por el anticuerpo monoclonal PAC-1, específico del complejo GPIIb/IIIa en su conformación activa (Figura 17B).

4.1.1.10. Coexpresión de GPIIb normal y [674R]GPIIb mutante

El contenido plaquetario de GPIIb en la madre de la paciente, heterocigota para la mutación [674R]GPIIb, se determinó mediante distintas técnicas (Tabla VII) obteniéndose valores de un 25-35% del control, aunque los niveles de RNA mensajero de GPIIb y GPIIIa eran normales. Si asumimos que un 50% de los

Figura 17

ENSAYOS DE UNIÓN DEL FIBRINÓGENO Y PAC-1 CON PLAQUETAS PORTADORAS DE COMPLEJOS [674R]GPIIb/IIIa.

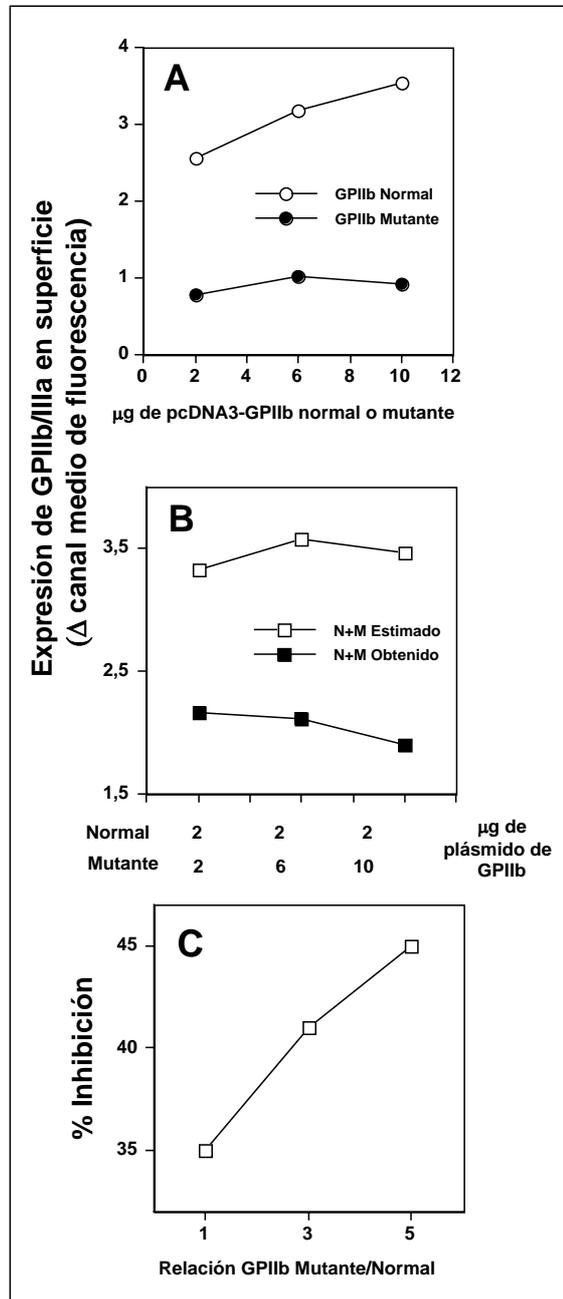


Panel superior: Las plaquetas del paciente tromboasténico, de su madre y de controles son tratadas con distintos activadores plaquetarios, incubadas con fibrinógeno-FITC y analizadas mediante citometría. Los resultados se expresan como porcentaje de los valores del control normal. Panel inferior: Los histogramas muestran la unión del anticuerpo PAC1-FITC a plaquetas del paciente y del control activadas con PMA y analizadas en el citómetro de flujo. El blanco o control negativo se realizó con plaquetas no activadas pero igualmente incubadas con PAC1.

transcritos derivan del alelo normal y el otro 50% del alelo portador de la mutación C674R, esperaríamos obtener al menos un contenido plaquetario de GPIIb del 50%, como lo visto en el caso del padre, o incluso mayor si consideramos que en las plaquetas de la paciente con sólo un 50% de RNAm mutado se llega a detectar una cantidad de [674R]GPIIb del ~10% del control. Una posible explicación de la menor expresión de complejos GPIIb/IIIa en la madre podría ser la competición entre los productos derivados del alelo normal y el mutado en alguna etapa limitante. Para estudiar esta posibilidad, cotransfectamos en células CHO-IIIa distintas cantidades de cDNA de GPIIb normal y/o mutado y medimos su expresión en superficie por citometría de flujo. En la figura 18A se representa la expresión de los complejos normales o mutados en función de la cantidad de cDNA transfectado. En este panel observamos que al aumentar la cantidad del plásmido pcDNA3-GPIIb normal también aumenta la expresión de complejos en superficie, por lo que suponemos que los niveles de GPIIIa en las células CHO-IIIa no son limitantes en estas condiciones experimentales. En las células transfectadas con [674R]GPIIb mutado se obtuvieron niveles de expresión más bajos en todos los casos y se observó un fenómeno de saturación a partir de 6 µg de plásmido transfectado, pues la adición de cantidades mayores no mejoró la expresión de GPIIb mutante en superficie. En el panel B de la figura 18 se muestran los valores obtenidos y estimados cuando se transfectan conjuntamente distintas cantidades de GPIIb normal y mutado. Los valores estimados se obtuvieron de acuerdo a los datos del panel A, asumiendo que la concentración de cDNA que se transfecta no es limitante y que la expresión en superficie de los productos de ambos cDNAs (normal y mutado) debe ser aditiva. Contrariamente a lo esperado, al cotransfectar GPIIb con cantidades iguales o mayores de [674R]GPIIb, los niveles de complejos detectados en la superficie fueron siempre menores a los obtenidos cuando únicamente se transfectaba GPIIb normal. Los resultados mostraron una creciente inhibición de la expresión de GPIIb/IIIa en función del cociente entre las cantidades de formas mutante y normal de GPIIb que se transfectan (Figura 18C). Partiendo de cantidades equimoleculares de cDNA normal y mutado, presumiblemente lo esperado en condiciones fisiológicas de heterocigosis, la inhibición obtenida fue de ~35%. Estos resultados indican que [674R]GPIIb, al tener alterada alguna etapa de su tráfico intracelular, incide negativamente en el correcto procesamiento de la subunidades normales de GPIIb.

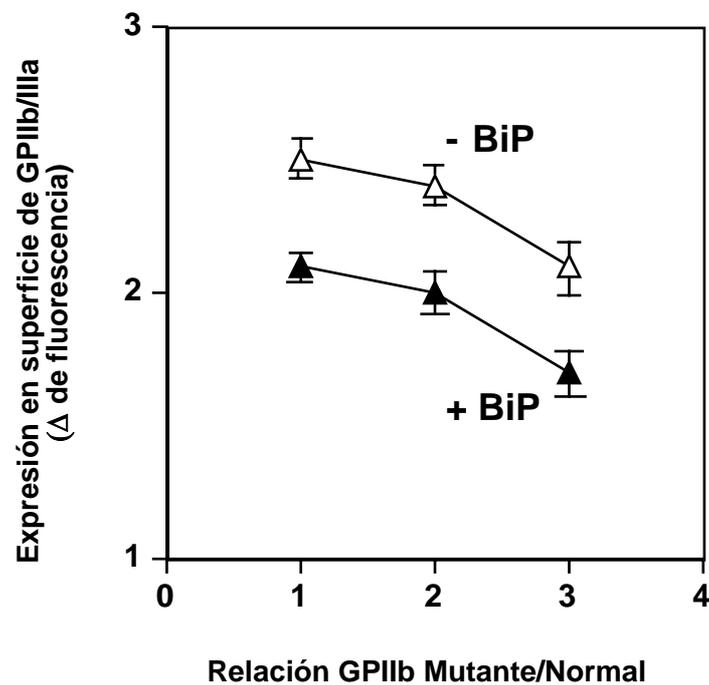
Figura 18

COEXPRESIÓN DE GPIIb Y [674R]GPIIb EN CÉLULAS CHO-IIIa



(A) Células CHO-IIIa son transfectadas transitoriamente con cantidades variables de cDNA de GPIIb normal o [674R]GPIIb. La expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa se analiza mediante citometría con anti-GPIIb. Los resultados son la media de, al menos, tres experimentos independientes realizados por duplicado. (B) Distintas proporciones de los cDNAs de GPIIb normal y [674R]GPIIb se cotransfectan en células CHO-IIIa y la expresión de heterodímeros GPIIb/IIIa se determina mediante análisis citofluorimétrico. Los valores estimados se obtienen asumiendo que, de acuerdo a los resultados del panel A, la expresión en superficie procedente de ambos cDNAs debe de ser aditiva. (C) Los porcentajes de inhibición de expresión en superficie de GPIIb/IIIa se calculan en base a las diferencias encontradas entre los valores estimados y los obtenidos del panel B.

Figura 19

COEXPRESIÓN DE BiP EN CÉLULAS CHO-IIIa TRANSFECTADAS CON GPIIb Y [674R]GPIIb

Células CHO-IIIa son transfectadas transitoriamente con cantidades variables de cDNA de GPIIb normal y [674R]GPIIb, como se describe en la figura 18, además de 4 μ g del plásmido de expresión pMT-BiP (L. Hendershot, St.Jude's Research Hospital, Memphis, USA) (+BiP) o del plásmido vacío (-BiP). Transcurridas 48 horas desde la transfección, la expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa se analiza mediante citometría de flujo con anti-GPIIb. Los resultados son la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Con arreglo a los resultados previos, la subunidad [674R]GPIIb mutada se encuentra asociada más establemente a BiP; por ello, una posible explicación de la competición observada entre las formas normal y mutante de GPIIb, podría ser la limitación de proteína chaperona disponible para el plegamiento de las subunidades. Para estudiar esta posibilidad, cotransfectamos el vector de expresión pMT-BiP-cDNA con cantidades variables de GPIIb normal y mutante en células CHO-IIIa (Figura 19). De acuerdo con los resultados obtenidos, la sobreexpresión de BiP no eliminó el efecto inhibitorio que produce [674R]GPIIb sobre la expresión de GPIIb normal. Por el contrario, se observó una mayor inhibición de la expresión superficial de complejos GPIIb/IIIa en todas las condiciones analizadas. La sobreexpresión de BiP debe incrementar los niveles de complejos [674R]GPIIb-BiP, perturbando de esta manera el tráfico intracelular de las subunidades normales de GPIIb.

4.2. PATOLOGÍAS MOLECULARES ASOCIADAS A FENOTIPOS TROMBOASTÉNICOS TIPO I

4.2.1. MUTACIÓN [288delC]GPIIb

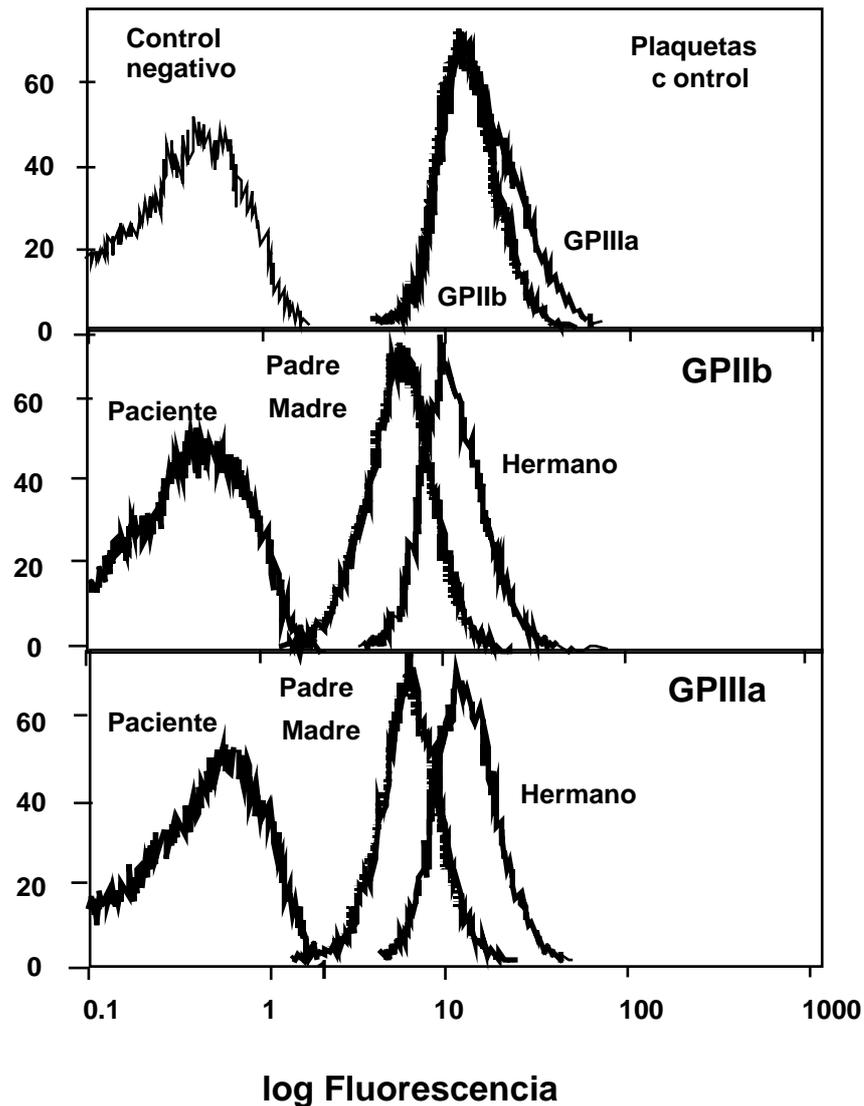
4.2.1.1. Datos clínicos

En este caso, los pacientes son dos hermanos de 20 y 18 años, con trastornos hemorrágicos severos y antecedentes de diátesis hemorrágica desde el nacimiento. Los padres no presentan ningún desorden hematológico y no reconocieron consanguinidad, pero creían haber oído que un bisabuelo había sufrido algún trastorno hemorrágico. Los estudios hematológicos realizados a los pacientes en el Hospital Insular de Gran Canarias, Las Palmas, revelaron un número de plaquetas normal, tiempos de hemorragia prolongados (>15 min) y problemas de coagulación. Se observó ausencia de agregación plaquetaria tanto espontánea como en respuesta a ADP, adrenalina, colágeno y ácido araquidónico, aunque si se pudo observar agregación en respuesta a ristocetina.

4.2.1.2. Niveles de GPIIb y GPIIIa en plaquetas

El análisis del contenido plaquetario del receptor GPIIb/IIIa en pacientes y familiares se realizó mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales

Figura 20

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA EXPRESIÓN DE GPIIb/IIIa EN PLAQUETAS DE UN CASO DE TROMBOASTENIA Y FAMILIARES

Plaquetas lavadas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos contra GPIIb o GPIIIa, como se describe en la sección de Métodos. Los histogramas son representaciones logarítmicas de la intensidad de fluorescencia frente al número de células. El panel superior muestra las señales de fluorescencia de GPIIb y GPIIIa de plaquetas controles. El control negativo representa la señal de fluorescencia de plaquetas incubadas sin anticuerpos específicos. Los paneles intermedio e inferior muestran, respectivamente, la expresión en superficie de GPIIb y GPIIIa en plaquetas del paciente, de sus padres y su hermano.

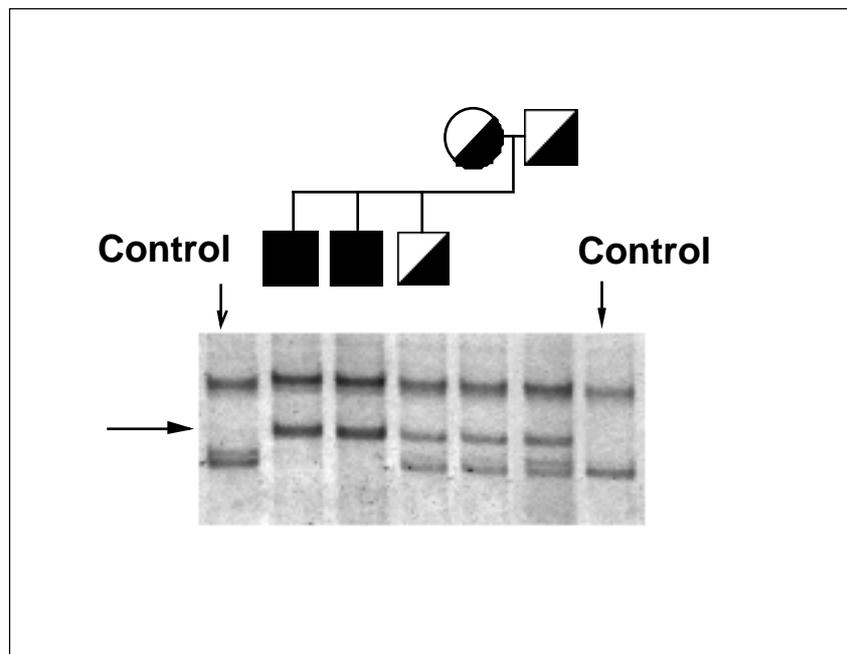
específicos para GPIIb y GPIIIa. En el histograma de la figura 20 se muestra como la intensidad de fluorescencia obtenida a partir de las plaquetas de los pacientes fue igual al control negativo, el cual se realiza adicionando únicamente el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína. Estos datos reflejan una ausencia total de complejos GPIIb/IIIa en la superficie plaquetaria de los pacientes. Los padres y el hermano presentaron una disminución significativa de complejos en comparación a individuos control. Según estos resultados, los pacientes padecerían una tromboastenia de Glanzmann tipo I.

4.2.1.3. Detección de mutaciones en GPIIb

Los genes GPIIb y GPIIIa de los pacientes fueron estudiados en busca de mutaciones mediante análisis de SSCP. De esta manera, el fragmento que comprende desde el exón 2 al 4 de GPIIb fue amplificado a partir de DNA genómico de los pacientes, padres, hermano e individuos control y el producto de amplificación digerido con Hinf I antes de su análisis por SSCP. El patrón electroforético obtenido en este caso se muestra en la figura 21. En los dos pacientes se observan bandas ausentes en los controles, pero también detectadas en los familiares estudiados. Uno de los controles presenta una banda ausente en el otro control, pero presente en otros miembros de la familia. Posteriormente, pudimos aclarar que esta banda era debida a un polimorfismo en una de las secuencias intrónicas carente de significado patológico. La secuenciación del fragmento de DNA utilizado en el análisis de SSCP reveló la existencia de una mutación homocigota en el exón 2 de ambos pacientes que consiste en la deleción de la citosina 288 del cDNA de GPIIb (Figura 22) que cambia la pauta del marco de lectura generando la aparición de un codón de terminación prematuro en el RNAm. Ambos progenitores y el hermano de los pacientes resultaron heterocigotos para esta misma mutación. Esta deleción no crea ni destruye sitios de restricción por lo que, por razones de simplicidad, la condición de portadores en los familiares la estudiamos mediante análisis de SSCP. Posteriormente a este estudio, tuvimos acceso a dos nuevos casos de tromboastenia cuyos ancestros eran de la misma localidad insular española que la de los pacientes descritos. Estos nuevos pacientes resultaron ser homocigotos para esta misma mutación. El árbol genealógico y la condición de portadores de las dos familias estudiadas aparecen representados en la figura 23.

Figura 21

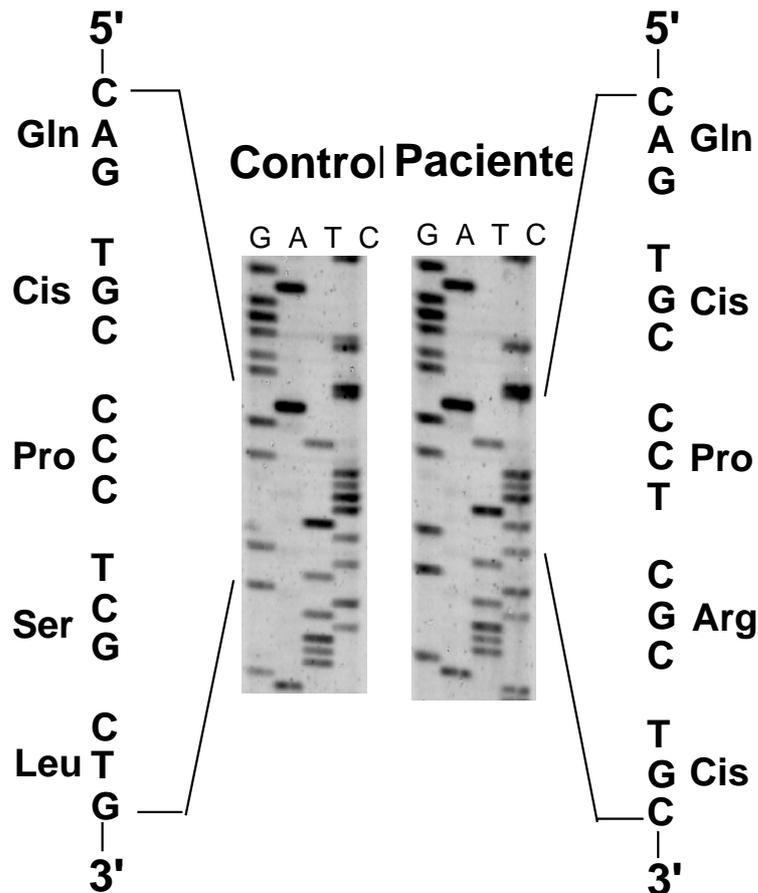
**ANÁLISIS DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE DNA
MONOCATENARIO (SSCP) DEL EXÓN 2 DE GPIIb DE PACIENTES
TROMBOASTÉNICOS Y SUS FAMILIARES**



Un fragmento de DNA de 734 pb que comprende los exones 2, 3 y 4 de GPIIb se amplificó a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos: 5'-GGGCCTGGGATACGCTGGAAT-3' y 5'-CCAGATCCAAAGCAAGGGC-3'. Los productos de amplificación fueron digeridos con Hinf I, obteniéndose fragmentos de 17, 160 y 557 pb que fueron resueltos mediante electroforesis a 15 °C en acrilamida al 14% con 8,7% de glicerol. Las bandas correspondientes al DNA monocatenario se visualizaron por tinción con nitrato de plata. La flecha señala una banda presente en los pacientes y sus familiares y ausente en los controles.

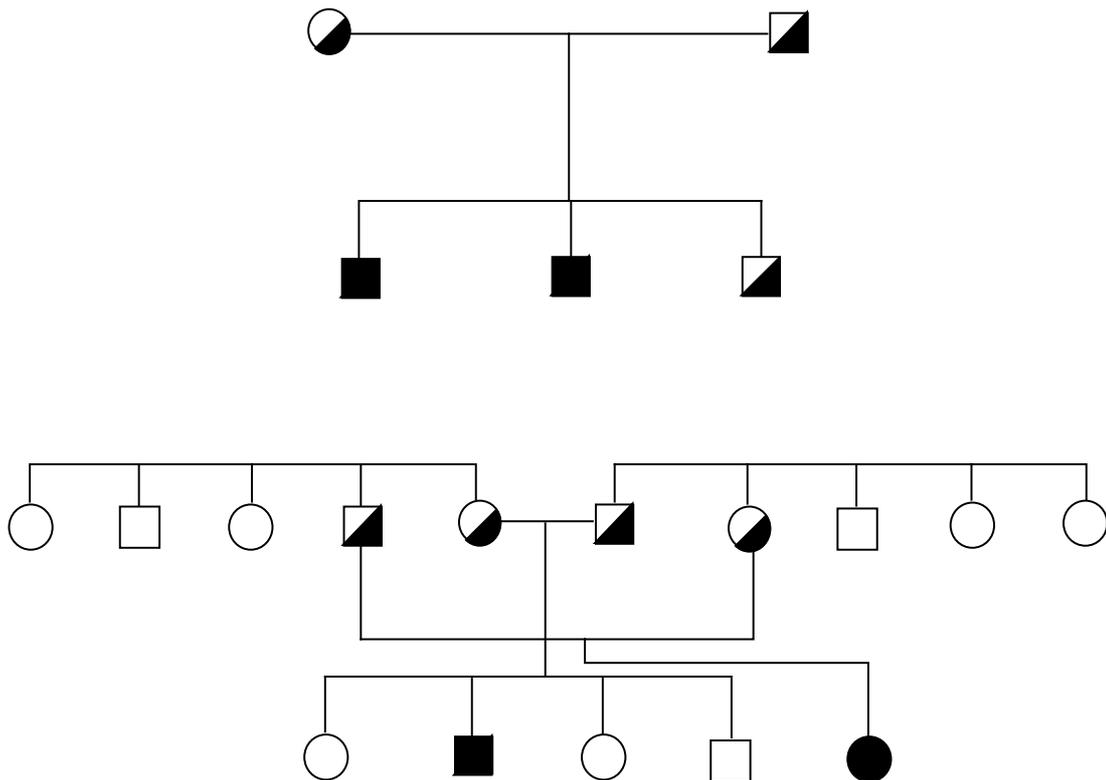
Figura 22

**IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN [288delC] EN EL EXÓN 2 DE GPIIb
EN UN PACIENTE DE TROMBOASTENIA**



Un fragmento de DNA de 734 pb que incluye el exón 2 de GPIIb se amplificó a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos: 5'-GGGCCTGGGATACGCTGGAAT-3' y 5'-CCAGATCCAAAGCAAGGGC-3'. Los productos de amplificación se clonaron en un vector T y se determinó la secuencia de nucleótidos de una mezcla de 10 clones. La figura muestra un fragmento de secuencia que comprende los nucleótidos 283 a 297 que codifican los aminoácidos 95 a 99 de GPIIb. La delección en el paciente de una de las cuatro citosinas en posiciones 288-291 genera un cambio en el marco de lectura con la sustitución de Ser⁹⁸Leu⁹⁹ por Arg⁹⁸Cys⁹⁹.

Figura 23

**ARBOL GENEALÓGICO DE DOS FAMILIAS PORTADORAS
DE UNA DELECCIÓN EN EL EXÓN 2 DE GPIIb**

El estado de portador en las familias de los pacientes con tromboastenia causada por una deleción en el exón 2 de GPIIb [288delC] se determinó mediante análisis de SSCP. Un fragmento de DNA de 734 bp que comprende los exones 2, 3 y 4 fue amplificado a partir de DNA genómico. Los productos de PCR se digirieron con Hinf I, obteniéndose fragmentos de 17, 160 y 557 pb que fueron resueltos mediante electroforesis a 15 °C en acrilamida al 14% conteniendo 8,7% de glicerol.

4.2.1.4. Análisis de los productos de transcripción de fragmentos del gen GPIIb normal y [288delC]GPIIb mutado mediante el vector Exontrap

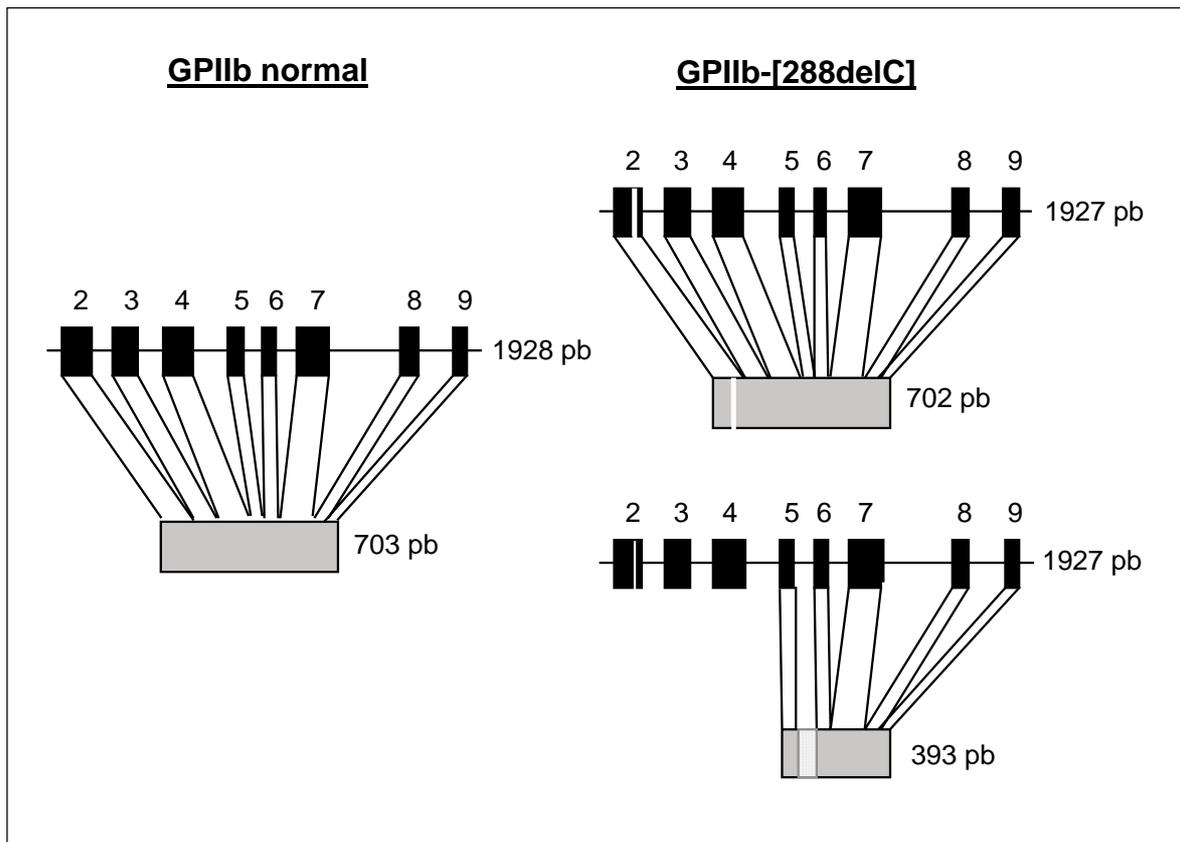
La mutación [288delC]GPIIb cambia la pauta del marco de lectura provocando la aparición de un codón de terminación prematuro en el RNAm. Estas mutaciones generan en ciertos casos un procesamiento alternativo del mensajero distinto al esperado. Para investigar esta posibilidad, se clona en el vector Exontrap pET01 (Mo Bi Tec; Auch y Reth, 1990) un fragmento de DNA genómico normal o [288delC] que comprende los exones 2 al 9 de GPIIb. El vector Exontrap incluye un exón 5' y otro 3' separados por un intrón que contiene un sitio de policlonación donde se introduce el fragmento de interés. Este vector recombinante se transfecta en células eucarióticas, donde se transcribe y genera un RNA maduro en el que las secuencias intrónicas del DNA genómico clonado son eliminadas. A partir de RNA total de células CHO transfectadas y mediante RT-PCR, se amplifican con oligos específicos los transcritos generados y se clonan en un vector T para su secuenciación. La figura 24 muestra los resultados obtenidos de la secuenciación de estos productos. En las células transfectadas con el vector que contiene GPIIb normal, sólo se obtuvieron transcritos de 703 pb con un patrón correcto de procesamiento de los exones. En las células transfectadas con pET01-GPIIb [288delC] se obtuvieron mayoritariamente transcritos de 702 pb, tamaño esperado debido a la deleción de una citosina, pero con un procesamiento perfectamente normal. Sólo uno de los transcritos analizados mostró un tamaño menor, de 393 pb, como resultado de la pérdida de los exones 2 al 4 y la inserción del intrón 5 de 76 pb (Figura 24).

4.2.1.5. Cuantificación y análisis de RNA mensajeros de GPIIb y GPIIIa en plaquetas

La determinación cuantitativa de los niveles de RNAm de GPIIb y GPIIIa en las plaquetas de los pacientes y de ambos padres se realiza mediante RT-PCR utilizando sondas TaqMan fluorescentes. La figura 25 muestra los resultados obtenidos, donde se aprecia una acusada disminución del RNAm de GPIIb en ambos pacientes, con un contenido entre 10-12 veces menor que el de los controles. Los padres, heterocigotos para la mutación [288delC], también presentan una reducción de RNAm-GPIIb de aproximadamente un 50%. En contraste, los valores obtenidos para el RNAm de GPIIIa fueron muy similares en pacientes, padres y controles, indicando que el gen de

Figura 24

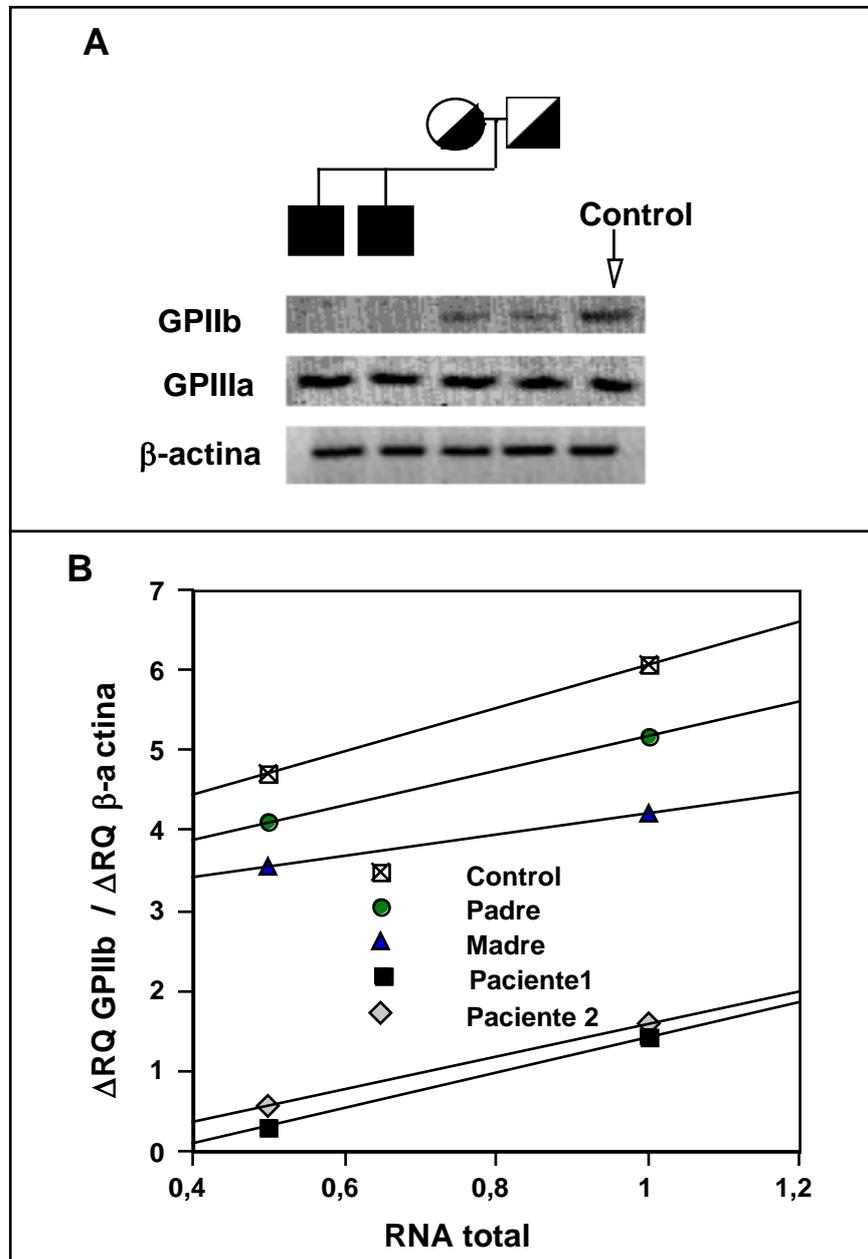
**ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCIÓN DE GPIIb [288delC]
CON EL VECTOR EXONTRAP**



Fragmentos de DNA genómico que contienen desde el exón 2 al 9 de GPIIb, procedentes de un paciente o de un control, son subclonados en el vector pET01 y transfectados en células CHO. A partir del RNA total de células CHO transfectadas y mediante RT-PCR, se amplifican con oligonucleótidos específicos los transcritos generados y se clonan en un vector T para su secuenciación. La figura muestra el procesamiento sufrido por el RNA mensajero de GPIIb normal y de GPIIb-[288delC]. Las cajas negras representan los exones y las franjas blancas corresponden a las deleciones encontradas.

Figura 25

CUANTIFICACIÓN DEL RNAm DE GPIIb DE PLAQUETAS DE LA FAMILIA CON LA MUTACIÓN [288delC] EN GPIIb



La cuantificación, basada en amplificación por RT-PCR, de los RNAs mensajeros de β -actina, GPIIb y GPIIIa de plaquetas de los dos pacientes, familiares heterocigotos e individuos controles, se realizó usando el sistema TaqMan (Perkin-Elmer), como se detalla en la sección de Métodos. (A) Los productos de amplificación de GPIIb, GPIIIa y β -actina, obtenidos a partir de una de las concentraciones de RNA total utilizadas, se someten a electroforesis en geles de agarosa al 3% para verificar que se obtiene una única banda del tamaño esperado y visualizar el grado de amplificación. (B) El incremento de emisión de fluorescencia (Δ RQ) de las sondas específicas TaqMan se mide al final de la reacción y los valores obtenidos para GPIIb y GPIIIa se normalizan con los de la β -actina en cada una de las muestras. En este panel se representan los valores del cociente Δ RQ GPIIb / Δ RQ β -actina frente a la cantidad de RNA total utilizado como templado de la reacción.

GPIIIa continúa transcribiéndose con normalidad a pesar de la falta de expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa.

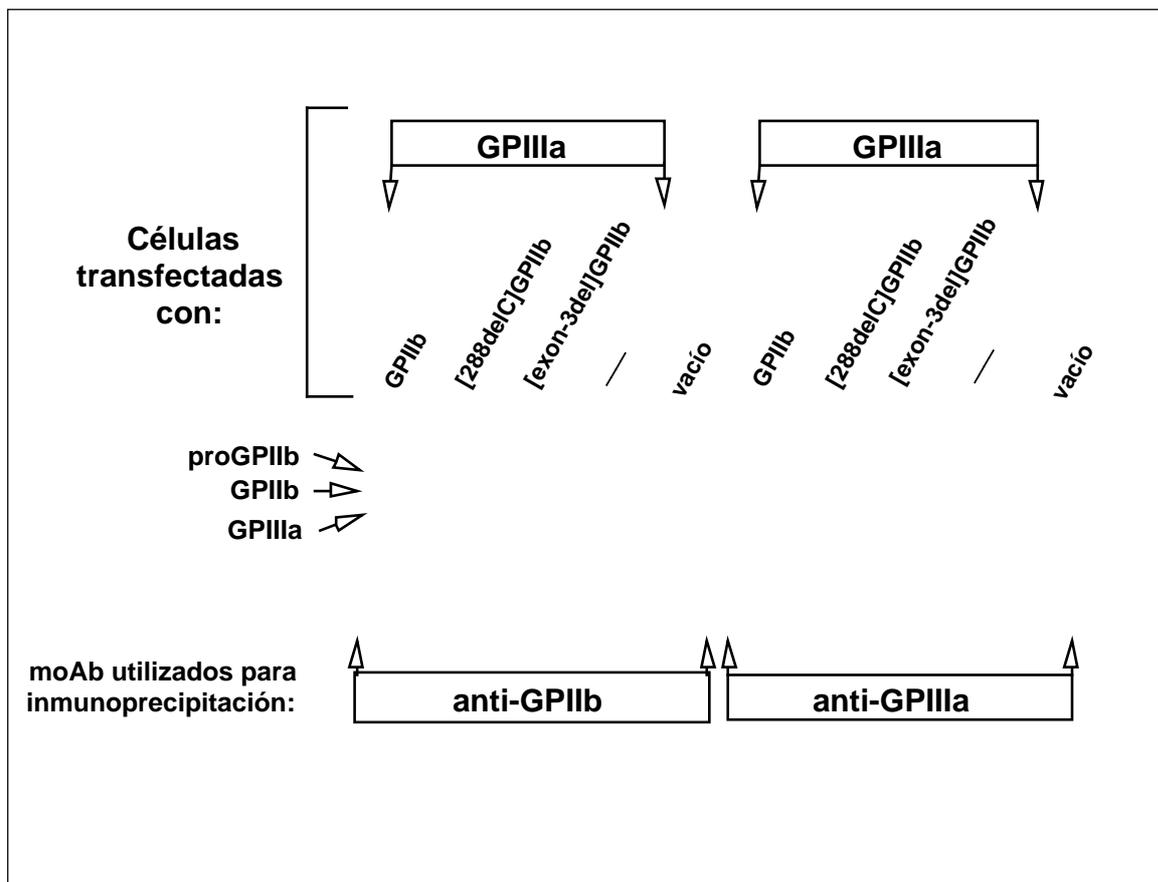
Para el análisis de la estructura primaria del RNAm-GPIIb de los pacientes, se amplificó el extremo 5' del cDNA, se clonó en un vector T y un número significativo de clones fueron secuenciados. La mayoría de ellos contenían correctamente todos los exones y sólo mostraban la mutación [288delC]. Uno de los clones secuenciados presentaba una deleción de un fragmento de 98 pb que codifica el exón 3 de GPIIb y comprende los residuos 311-408. La deleción de este fragmento de 98 pb permite que se recupere la pauta del marco de lectura, por lo cual la traducción de este mensajero dará lugar a una proteína GPIIb con sustituciones en los aminoácidos 98 al 103 y una deleción desde el aminoácido 104 al 136 pertenecientes al exón 3. La cantidad de esta forma de RNAm debe ser muy reducida, dada su escasa representación, por lo que es improbable que tenga algún significado fisiológico.

4.2.1.6. Expresión heteróloga de GPIIb normal y [288delC]GPIIb mutante en células CHO

En las plaquetas del paciente se detectaron 2 tipos de transcritos de GPIIb: El RNAm-GPIIb-[288delC], de representación mayoritaria, cuya traducción generaría un polipéptido de 109 residuos y otro de muy escasa representación, el [exon-3del]GPIIb, que daría lugar a una proteína con una deleción interna de 33 aminoácidos pertenecientes al exón 3. El contenido plaquetario de ambos mensajeros es muy bajo, por lo que es improbable que los productos de traducción de estos mensajeros desempeñen algún papel fisiológico; no obstante, es interesante analizar si estas formas mutadas de GPIIb son capaces de formar heterodímeros con GPIIIa y/o expresarse en la membrana plasmática. Con esta finalidad, se transfectaron células CHO con el vector de expresión pcDNA3 conteniendo GPIIIa, GPIIb normal, [288delC]GPIIb, o [exon-3del]GPIIb. El cDNA de [288delC]GPIIb se preparó por el método de extensión de fragmentos solapables mediante PCR. Para la construcción del plásmido pcDNA3-GPIIb-[exon-3del], el fragmento Sac II-Not I del cDNA de GPIIb con la deleción del exón 3 se amplificó a partir del RNA de plaquetas del paciente por RT-PCR y se sustituyó este fragmento mutado en el cDNA de GPIIb. La expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa en las células transfectadas se midió mediante citometría de flujo. En células transfectadas con GPIIIa y GPIIb normal se

Figura 26

**ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE COMPLEJOS GPIIb/IIIa DE
CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS CON
[288delC]GPIIb Y [exon-3del]GPIIb**



Células CHO son transfectadas transitoriamente con los cDNAs de GPIIIa y GPIIb normal, [288delC]GPIIb o [exon-3del]GPIIb. Los lisados de las células son marcados con biotina y los complejos GPIIb/IIIa son inmunoprecipitados con anti-GPIIb o anti-GPIIIa. Los inmunocomplejos se precipitan mediante la incubación con proteína A-Sepharosa a 4 °C y son eluidos en un tampón reductor. Las proteínas inmunoprecipitadas se someten a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y se procesan como se describe en la sección de Métodos.

observó la presencia de complejos en superficie con anticuerpos de ambas subunidades. En las células transfectadas con GPIIIa y [288delC]GPIIb o [exon-3del]GPIIb únicamente se observó la presencia en superficie de GPIIIa, confirmando observaciones anteriores de que esta subunidad es capaz de expresarse en superficie, probablemente formando heterodímeros con subunidades α endógenas. Las células transfectadas también se analizaron mediante inmunoprecipitación de los lisados celulares con anticuerpos contra ambas glucoproteínas. Como puede verse en la figura 26, la inmunoprecipitación con anti-GPIIb de células transfectadas con GPIIb normal permite la detección de tres bandas correspondientes a proGPIIb, GPIIb y GPIIIa. En las células transfectadas con [288delC]GPIIb no se inmunoprecipitó ninguna proteína con anti-GPIIb, mientras que en las transfectadas con [exon-3del]GPIIb se obtuvo una banda de un peso molecular ligeramente inferior al de proGPIIb. En ninguno de estos dos casos se detectó la subunidad GPIIIa utilizando el anticuerpo anti-GPIIb para la inmunoprecipitación. Por lo tanto, en las células transfectadas con las formas mutantes de GPIIb sólo se detectan subunidades GPIIIa cuando se inmunoprecipita con su anticuerpo específico. Según estos resultados, la delección del exón 3 de GPIIb da lugar a un mensajero que permite la síntesis de una subunidad proGPIIb de menor tamaño incapaz de heterodimerizar con GPIIIa.

4.2.2. MUTACIÓN Arg⁵⁹⁷ → STOP EN EL EXÓN 19 DE GPIIb

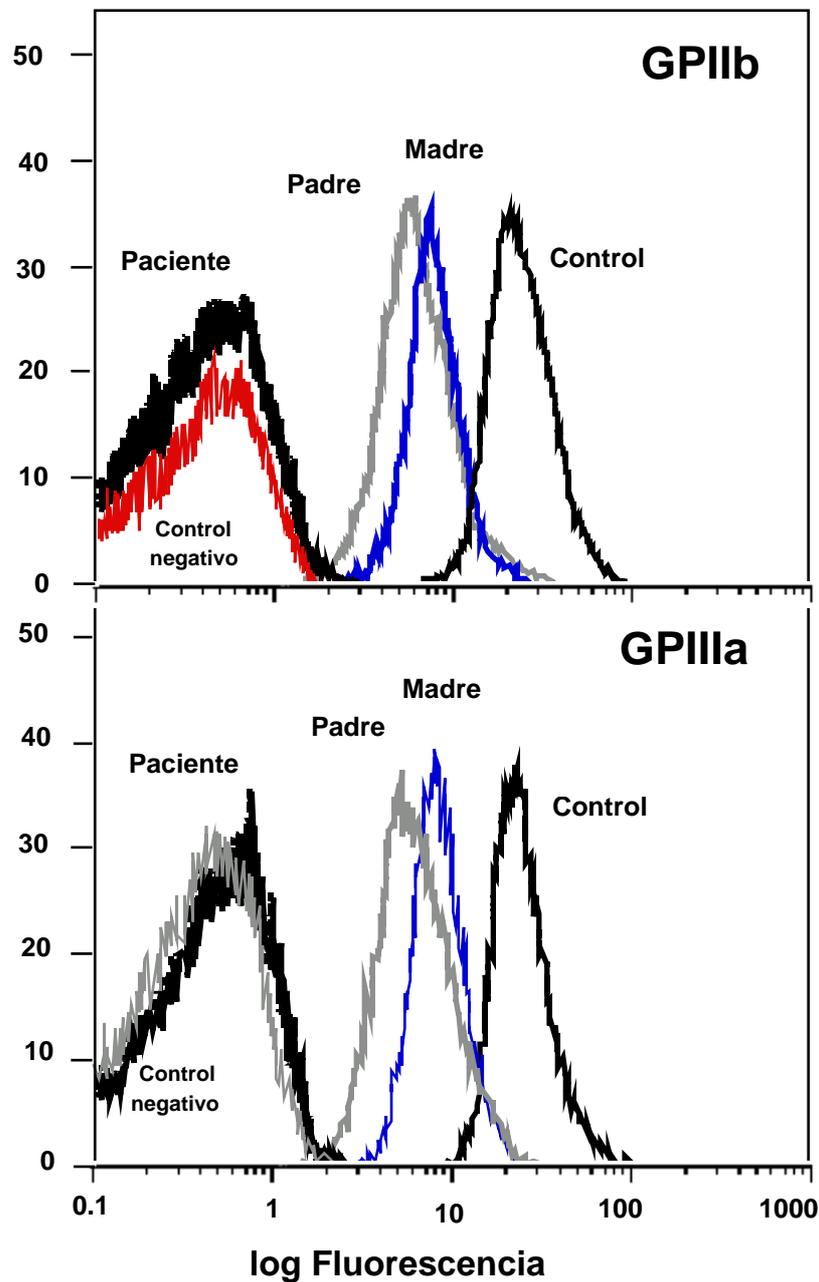
4.2.2.1. Datos clínicos

El paciente es un varón de 7 años de edad que presenta una historia de diátesis hemorrágica desde el nacimiento y sin antecedentes conocidos de consanguinidad ni trastornos hemorrágicos en sus familiares. En los análisis hematológicos se obtuvieron tiempos de hemorragia muy prolongados, plaquetas de tamaño y número normal pero con ausencia de agregación tanto espontáneamente como en respuesta a ADP, adrenalina o colágeno, pero si en respuesta a ristocetina.

4.2.2.2. Contenido plaquetario de GPIIb y GPIIIa

El estudio de citometría de flujo reveló ausencia total de complejos GPIIb/IIIa en las plaquetas del paciente y una reducción significativa en ambos progenitores (Figura 27). Se detectaron complejos $\alpha_v\beta_3$ en las plaquetas del paciente, lo cual indica que la

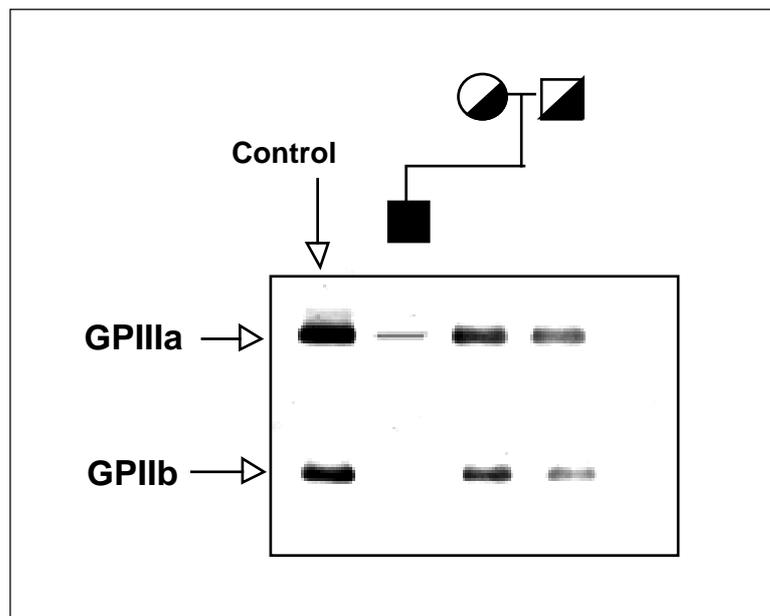
Figura 27

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE GPIIb/IIIa EN PLAQUETAS DEL PACIENTE TROMBOASTÉNICO Y FAMILIARES

Las plaquetas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales contra GPIIb o GPIIIa y analizadas mediante citometría de flujo, como se describe en la sección de Métodos. Los histogramas son representaciones logarítmicas de la intensidad de fluorescencia frente al número de células. Los paneles superior e inferior muestran, respectivamente, las señales de fluorescencia de GPIIb y GPIIIa en plaquetas de controles, del paciente y de sus progenitores. El control negativo representa la fluorescencia obtenida en plaquetas incubadas sin anticuerpos específicos.

Figura 28

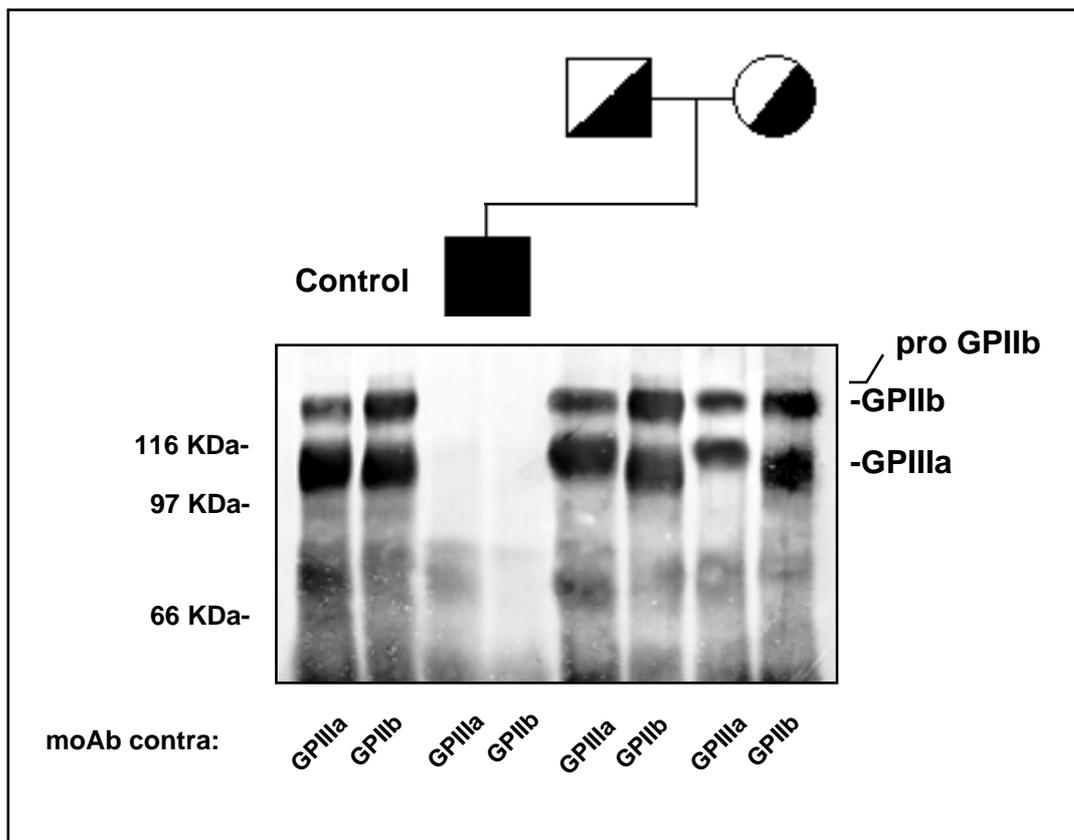
**ANÁLISIS DE WESTERN DEL CONTENIDO DE GPIIIa Y GPIIb EN
PLAQUETAS DE LA FAMILIA PORTADORA DE LA MUTACIÓN
Arg⁵⁹⁷→STOP EN EL EXÓN 19 DE GPIIb**



Las plaquetas son lisadas mediante sonicación y la fracción particulada, solubilizada en detergente, se utilizó para el análisis de western. Alícuotas de 20 μg de proteína del paciente y 10 μg de proteína de los padres y control fueron resueltas mediante geles de SDS-poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-GPIIIa o anti-GPIIb y fueron procesadas como se describe en Métodos.

Figura 29

**ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE GPIIb Y GPIIIa EN
PLAQUETAS DE LA FAMILIA PORTADORA DE LA MUTACIÓN
Arg⁵⁹⁷→STOP EN EL EXÓN 19 DE GPIIb**



Las proteínas de los lisados de plaquetas del paciente y familiares son marcadas con biotina y los complejos GPIIb/IIIa son inmunoprecipitados con anticuerpos específicos. El material precipitado se resuelve en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y se transfiere a membranas de nitrocelulosa que son procesadas como se indica en Materiales y Métodos.

ausencia de complejos GPIIb/IIIa debe ser causada por ausencia o deficiencia de subunidades GPIIb. El contenido de GPIIb y GPIIIa en lisados de plaquetas se analizó también mediante análisis de western (Figura 28) e inmunoprecipitación (Figura 29) de cada subunidad. En ninguno de estos análisis se detectó GPIIb en las plaquetas del paciente y se observó además una importante reducción del contenido de GPIIIa. Los padres también presentaron niveles plaquetarios reducidos de ambas subunidades. Estas observaciones confirman el diagnóstico clínico de enfermedad de Glanzmann y permiten definirla como tipo I en base a la ausencia total del receptor plaquetario GPIIb/IIIa.

4.2.2.3. Localización de mutaciones en GPIIb

La amplificación de los exones de GPIIb y su análisis por el método de polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (SSCP) permitió desvelar la existencia de una mutación en el exón 19 de GPIIb del paciente. Como muestra la figura 30, el patrón electroforético observado en el paciente fue distinto al del individuo control, con la aparición de nuevas bandas y desaparición de otras presentes en el control. Mediante este análisis también se determinó que el abuelo paterno, los padres y tres hermanos eran heterocigotos para esta misma mutación, pues su patrón electroforético posee tanto las bandas observadas en el control como en el paciente. La secuenciación del exón 19 (Figura 31) permitió detectar una transición C→T en la posición 1882 del cDNA de GPIIb que cambia el residuo arginina 597 por un codón TGA de terminación.

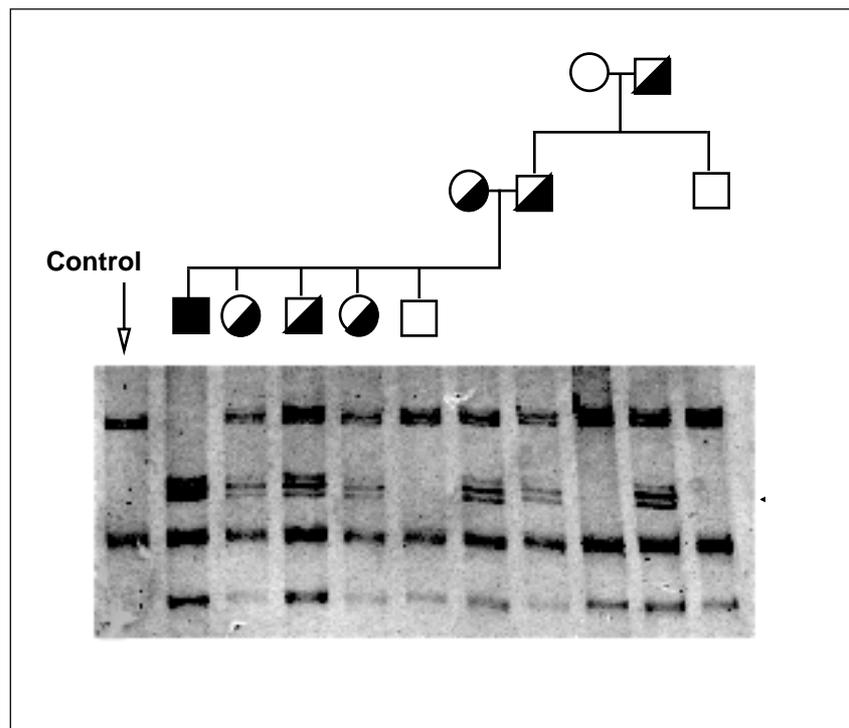
La verificación y detección de portadores de esta mutación en los miembros de la familia se llevó a cabo por dos procedimientos (Figura 32): amplificación específica de alelos por PCR (ASPCR), utilizando oligonucleótidos con el extremo 3' complementario a la secuencia normal o a la mutada (Figura 32A), y mediante análisis de restricción (Figura 32B), aprovechando que esta mutación genera un sitio Nla III en la posición 1880 del cDNA de GPIIb. Ambos métodos confirmaron los resultados obtenidos previamente por SSCP.

4.2.2.4. Cuantificación del RNAm de GPIIb y GPIIIa en plaquetas

La mutación C¹⁸⁸²→T en el cDNA de GPIIb provoca la aparición de una señal de terminación en el residuo 597 de esta proteína, sin embargo, mediante la

Figura 30

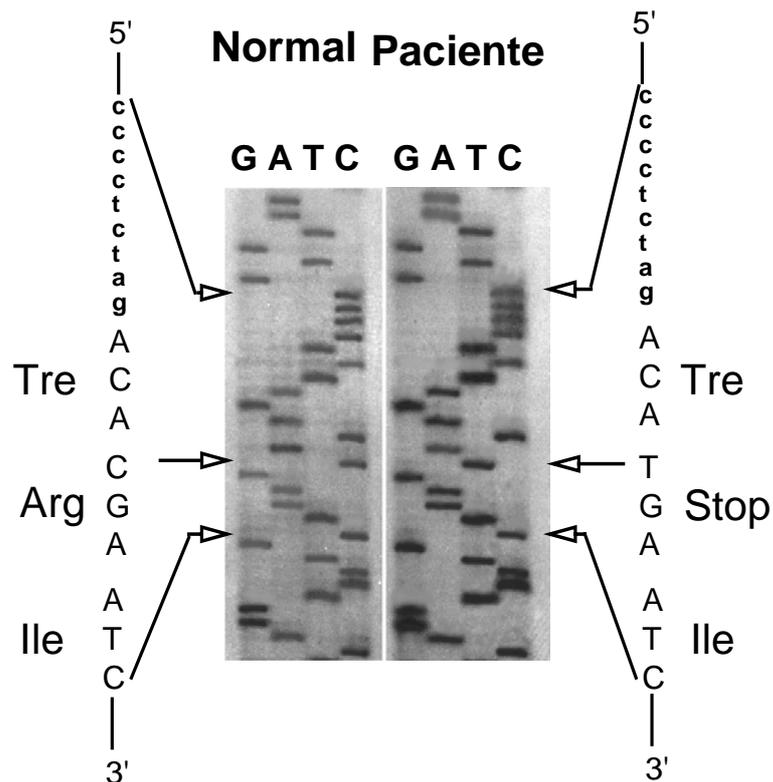
ANÁLISIS DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE DNA MONOCATENARIO (SSCP) DEL EXÓN 19 DE GPIIb DE UN PACIENTE TROMBOASTÉNICO Y SU FAMILIA



Un fragmento de DNA de 184 pb que comprende el exón 19 de GPIIb se amplificó a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos: 5'-TAAACCTCACACATCCCAAC-3' y 5'-AAGGTGTGGAGCAGGTATGAT-3'. Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis a 15 °C en acrilamida al 16%. Las bandas correspondientes al DNA monocatenario se visualizaron por tinción con nitrato de plata.

Figura 31

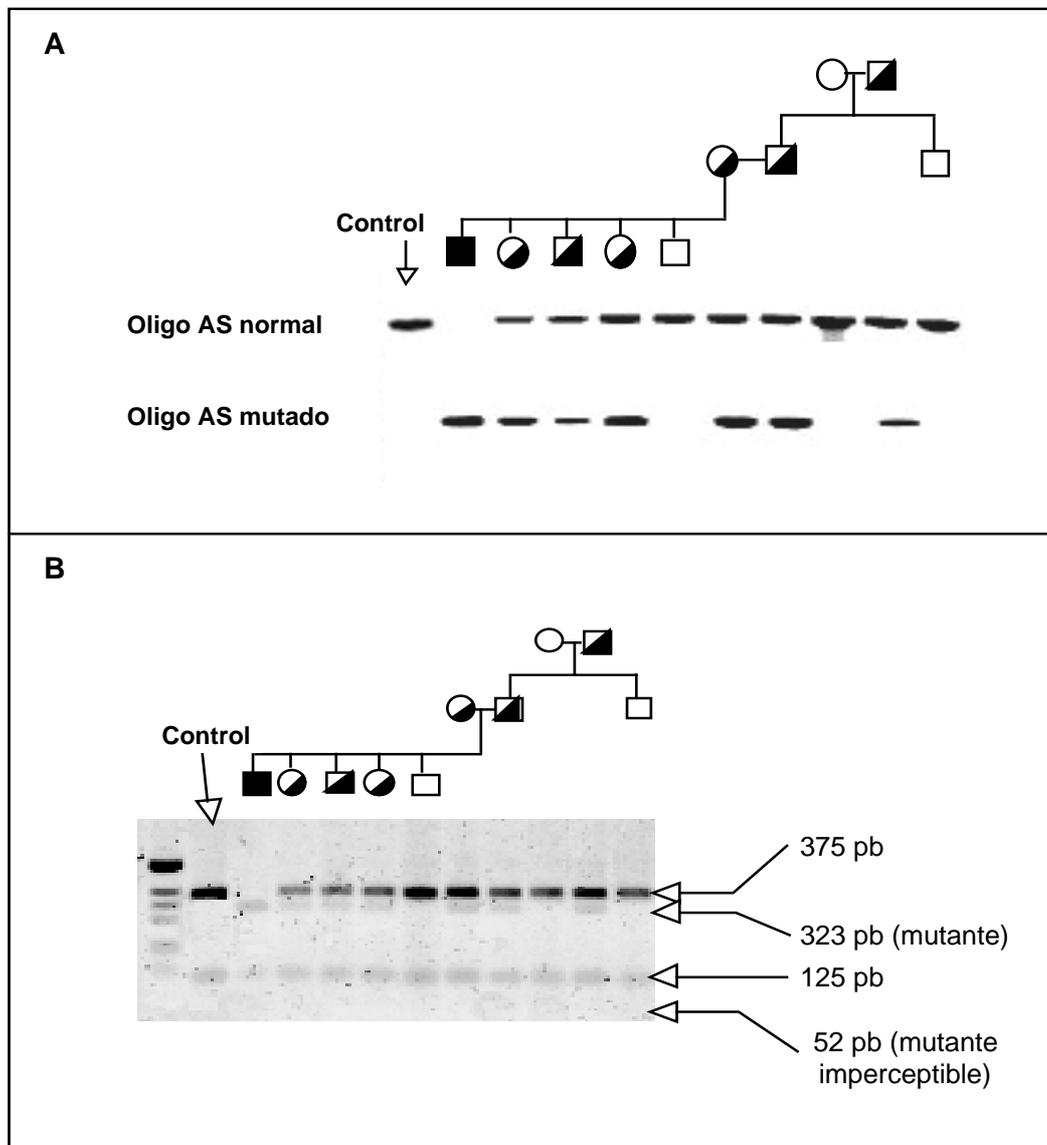
**IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN C¹⁸⁸²→T EN EL EXÓN 19 DE GPIIb
EN UN PACIENTE DE TROMBOASTENIA**



Un fragmento de DNA de 184 pb que comprende el exón 19 de GPIIb fue amplificado a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos 5'-TAAACCTCACACATCCCCAAC-3' y 5'-AAGGTGTGGAGCAGGTATGAT-3'. Los productos de amplificación se clonaron en un vector T y se secuenciaron una mezcla de 10 clones. La figura muestra fragmentos de secuencia que incluyen los nucleótidos 1879 a 1887 que codifican los aminoácidos 596-598 de GPIIb. Las flechas señalan la transversión homocigota C¹⁸⁸²→T que genera un codón de terminación (Stop) en la posición de la Arg⁵⁹⁷.

Figura 32

DETECCIÓN DE PORTADORES DE LA MUTACIÓN C¹⁸⁸²→T EN EL EXÓN 19 DE GPIIb EN LA FAMILIA DEL PACIENTE



(A) Amplificación específica de alelos (ASPCR) de un fragmento del exón 19 de GPIIb del paciente de tromboastenia y sus familiares. El fragmento de DNA de 1178 pb que comprende el exón 18 y parte del exón 19 de GPIIb se amplificó a partir de DNA genómico del paciente tromboasténico portador de la mutación C¹⁸⁸²→T y sus familiares. Cada una de las reacciones de amplificación se realizó usando el oligonucleótido 18S: 5'-AGGTGGGATGTGTATGGTAGC-3' y los oligonucleótidos antisense 5'-CCACCGTCCAGGACGATTCG-3' o 5'-CCACCGTCCAGGACGATTCA-3', cuyos extremos 3' son complementarios a la secuencia normal o a la secuencia mutada, respectivamente. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

(B) Análisis de restricción con NlaIII del exón 19 de GPIIb en la familia portadora de la mutación C¹⁸⁸²→T. Un fragmento de DNA de 500 pb que incluye los exones 19 y 20 de GPIIb fue amplificado a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos 19S: 5'-TAAACCTCACACATCCCCAAC-3' y 20AS: 5'-AAAGCAGAAGAGAAGAGGGACT-3'. Los productos de amplificación fueron digeridos con Nla III y resueltos en agarosa al 1,5%. La digestión del alelo normal produce fragmentos de 375 y 125 pb, mientras que la del alelo mutante genera productos de 323, 125 y 52 pb.

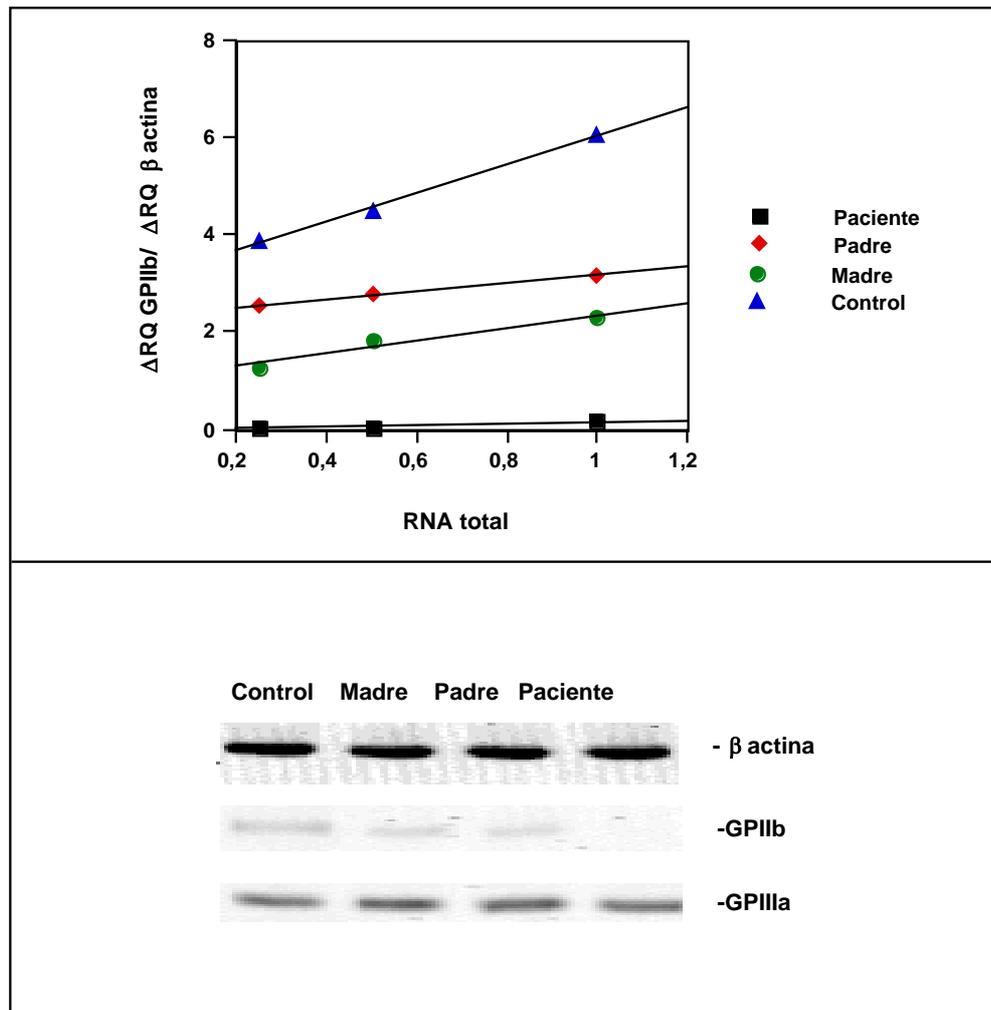
inmunoprecipitación de lisados de plaquetas del paciente no se detectó ninguna forma truncada de GPIIb. La ausencia de esta proteína podría deberse a disminución o ausencia de RNAm debido a inestabilidad por la presencia de un codón prematuro de terminación. Por ello, realizamos un análisis cuantitativo de los RNAs mensajeros de GPIIb y GPIIIa a partir del RNA total obtenido de plaquetas del paciente y sus progenitores mediante RT-PCR con sondas TaqMan específicas. La figura 33 muestra el incremento de la emisión de fluorescencia obtenida en la amplificación del mensajero de GPIIb (Δ RQ-GPIIb) en función de la cantidad de RNA total utilizado como templado de la reacción. Estos valores se normalizan con los obtenidos de la amplificación de β -actina en las mismas condiciones. El panel inferior de esta figura muestra los productos obtenidos por RT-PCR en una de las condiciones experimentales al ser sometidos a electroforesis en geles de agarosa. Los resultados indicaron una grave reducción del RNAm de GPIIb en el paciente y una disminución menos acusada en el caso de los progenitores. Un fragmento de RNA mensajero de GPIIb de ambos padres que contiene el exón 19 se amplificó para su posterior secuenciación, obteniéndose únicamente la secuencia correspondiente al alelo normal. Esto parece indicar que la disminución de mensajero en los padres es causada por la falta de transcritos procedentes del alelo mutado. Tanto el paciente como sus familiares poseen unos niveles de RNAm de GPIIIa similares al control, indicando que la disminución del contenido de esta subunidad en las plaquetas del paciente no es debida a un cambio en su tasa de transcripción, sino al déficit de la glucoproteína GPIIb con la cual heterodimeriza para alcanzar la superficie celular.

4.2.2.5. Expresión heteróloga de GPIIb[Δ 597] en células CHO-IIIa

La ausencia casi total de RNAm de GPIIb en el paciente justifica la imposibilidad de detectar la proteína truncada GPIIb[Δ 597] en lisados de plaquetas; sin embargo, quisimos estudiar mediante la transfección del cDNA de GPIIb[Δ 597] en células CHO-IIIa si la proteína truncada producto de traducción de esta mutación es capaz de dimerizar con GPIIIa y expresarse en superficie. En la figura 34 se presentan los resultados obtenidos. Las células transfectadas con la subunidad GPIIb normal e inmunoprecipitadas con anti-GPIIb y anti-GPIIIa, muestran las bandas correspondientes a los pesos moleculares de ambas subunidades. Con estos mismos anticuerpos, en las células transfectadas con GPIIb[Δ 597] no se pudo detectar ninguna

Figura 33

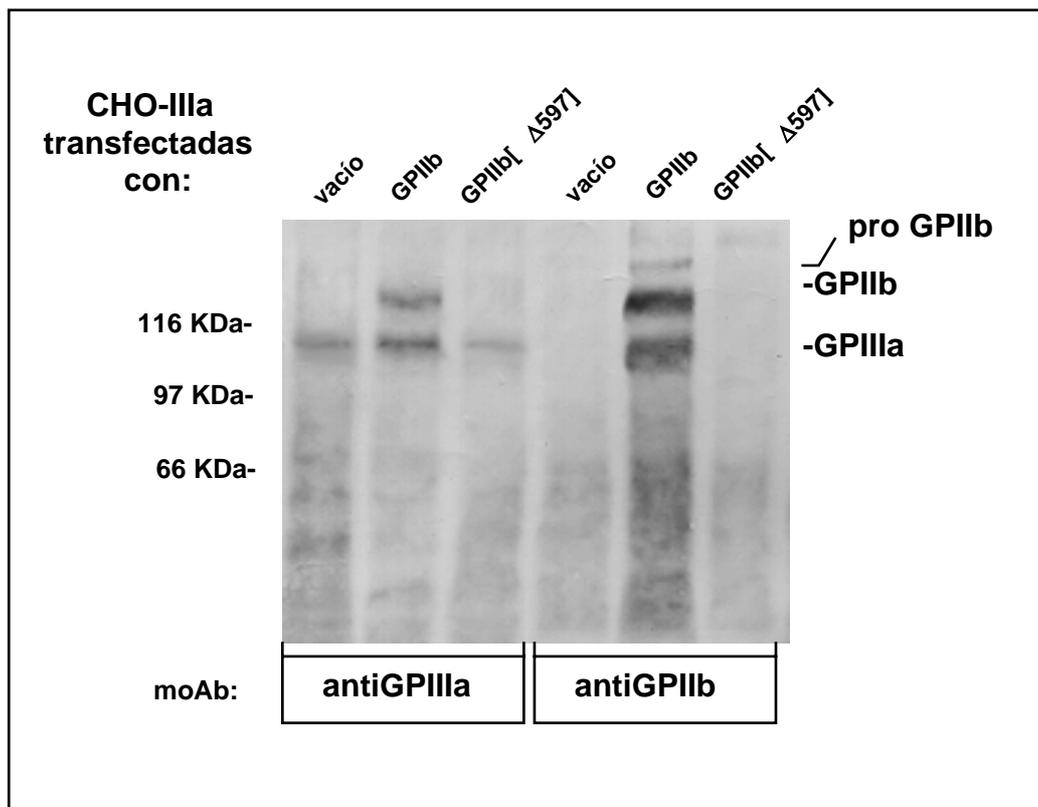
CUANTIFICACIÓN DEL RNAm DE GPIIb y GPIIIa DE PLAQUETAS DE LA FAMILIA CON LA MUTACIÓN Arg⁵⁹⁷ → STOP EN EL EXÓN 19 DE GPIIb



La cuantificación, mediante amplificación por RT-PCR, de los RNAs mensajeros de β -actina, GPIIb y GPIIIa de plaquetas del paciente, progenitores e individuos control, se realizó usando el sistema TaqMan (Perkin-Elmer), como se describe en Materiales y Métodos. El incremento de fluorescencia (ΔRQ) de las sondas específicas TaqMan se mide al final de la reacción y los valores obtenidos para GPIIb y GPIIIa se normalizan con los de la β -actina en cada una de las muestras. En el panel superior, se representan los valores del cociente $\Delta RQ \text{ GPIIb} / \Delta RQ \beta\text{-actina}$ frente a la cantidad de RNA total utilizado como templado de la reacción. El panel inferior muestra los productos de amplificación de GPIIb, GPIIIa y β -actina obtenidos a partir de una de las condiciones utilizadas y sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Figura 34

ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE COMPLEJOS GPIIb/IIIa DE CÉLULAS CHO-IIIa TRANSFECTADAS CON GPIIb[Δ597]



Células CHO-IIIa son transfectadas transitoriamente con los cDNAs de GPIIb normal o GPIIb[Δ597]. Las proteínas de la superficie celular son marcadas con biotina y los complejos GPIIb/IIIa son inmunoprecipitados con anticuerpos monoclonales anti-GPIIb o anti-GPIIIa. Las proteínas inmunoprecipitadas se someten a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, procesándose según lo descrito en el apartado de Métodos.

forma truncada de GPIIb, cuyo tamaño estimado sería de ~62 KDa. La imposibilidad de inmunoprecipitar GPIIb[Δ597] cuando se utiliza anti-GPIIIa parece indicar que esta proteína mutada es incapaz de heterodimerizar con GPIIIa.

4.2.3. MUTACIÓN Glu³²⁴ → Lys EN EL EXÓN 12 DE GPIIb

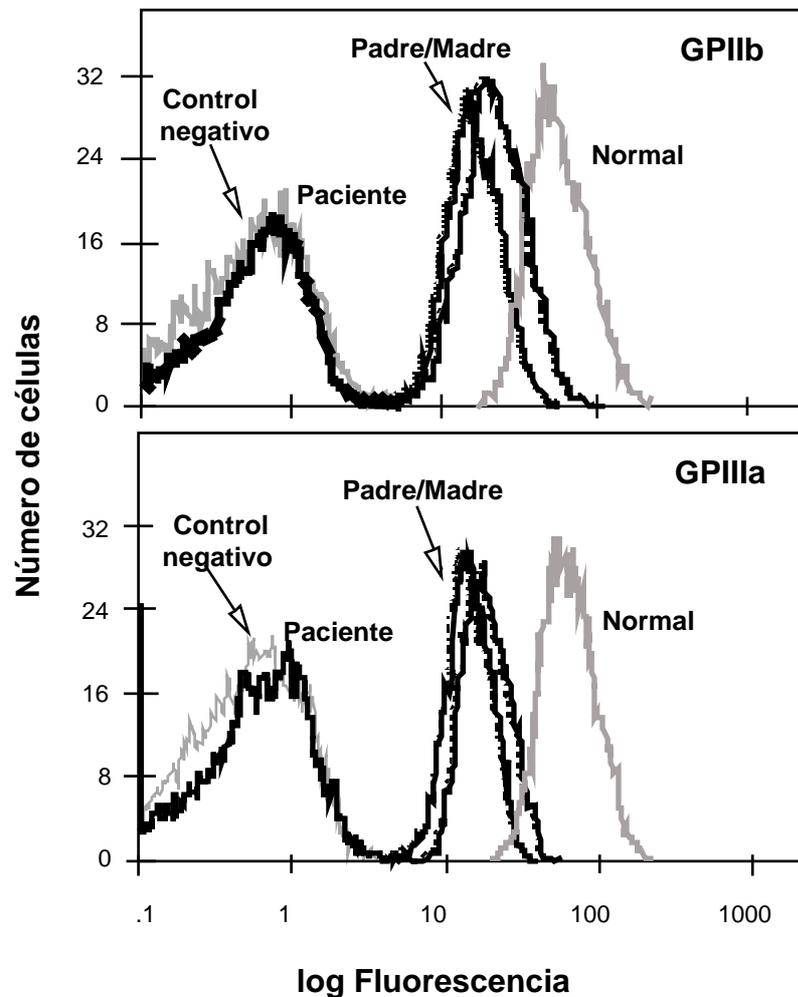
4.2.3.1. Datos clínicos

El paciente es un niño de etnia gitana de dos años de edad que sufre hemorragias mucocutáneas y hematomas espontáneos desde el nacimiento. Los análisis hematológicos mostraron tiempos de hemorragia prolongados, número y forma de las plaquetas normal y falta de agregación plaquetaria espontánea o en respuesta a agonistas, aunque reaccionan positivamente a ristocetina. Los padres no reconocieron consanguinidad ni desórdenes hematológicos en sus ancestros más inmediatos, pero informaron de una prima que sufría diátesis hemorrágica por causas que ellos ignoraban.

4.2.3.2. Contenido plaquetario de GPIIb y GPIIIa

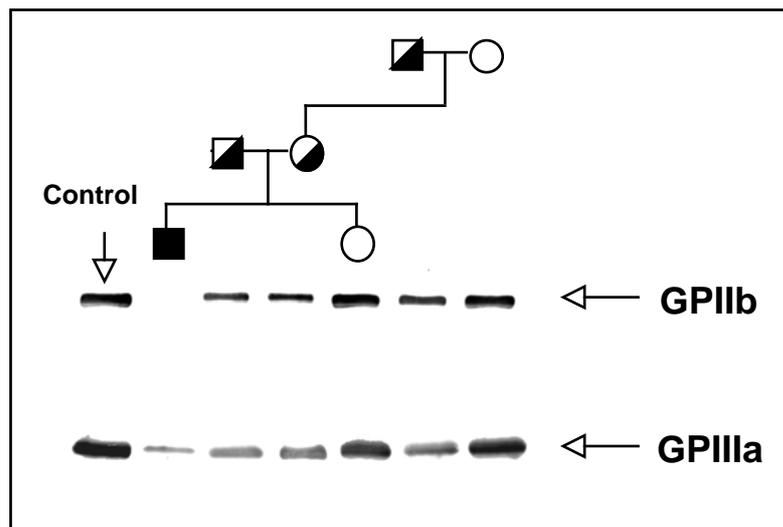
Los niveles de GPIIb y GPIIIa en las plaquetas del paciente, progenitores y controles, se determinaron por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales para cada subunidad (Figura 35). En las plaquetas del paciente se obtuvieron resultados iguales a los del control negativo, sugiriendo una ausencia total de complejos GPIIb/IIIa. Estos resultados indican que se trata de un caso de tromboastenia de Glanzmann de tipo I. Ambos progenitores mostraron una importante reducción del contenido plaquetario de GPIIb/IIIa. El análisis de inmunotransferencia realizado con lisados de plaquetas de esta familia fue consistente y confirmó los resultados obtenidos por citometría (Figura 36). En las plaquetas del paciente no había cantidades detectables de GPIIb y los niveles de GPIIIa estaban claramente reducidos. Los padres y el abuelo materno tenían un contenido de GPIIb y GPIIIa inferior al observado en los controles sanos, mientras que la hermana y la abuela materna poseían niveles normales.

Figura 35

ANÁLISIS CITOFUORIMÉTRICO DEL CONTENIDO DE GPIIb/IIIa EN LAS PLAQUETAS DEL PACIENTE Y FAMILIARES

Plaquetas lavadas son incubadas con anticuerpos monoclonales específicos contra GPIIb o GPIIIa como se describe en la sección de Métodos. Los histogramas son representaciones logarítmicas de la intensidad de fluorescencia frente al número de plaquetas. Los paneles superior e inferior muestran, respectivamente, las señales de fluorescencia de GPIIb y GPIIIa en plaquetas controles, del paciente y de sus progenitores. El control negativo corresponde a plaquetas incubadas sin anticuerpos específicos.

Figura 36

CONTENIDO DE GPIIb Y GPIIIa OBTENIDO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE WESTERN DE PLAQUETAS DEL PACIENTE Y FAMILIARES

El contenido de GPIIb y GPIIIa se determina por análisis de inmunotransferencia a partir de lisados totales de plaquetas del paciente, sus padres y abuelos maternos. Se analizan 10 μ g de proteínas totales en el caso del paciente y 3 μ g en el resto de miembros de la familia y controles. Las muestras se resuelven en geles de SDS-poliacrilamida y se transfieren a membranas de nitrocelulosa que se incuban con anticuerpos anti-GPIIb o anti-GPIIIa.

4.2.3.3. Identificación de la mutación de GPIIb responsable del fenotipo tromboasténico

Para la detección de posibles mutaciones en GPIIb y/o GPIIIa se amplificaron a partir de DNA genómico del paciente todos los exones y regiones intrónicas adyacentes y se analizaron mediante SSCP (Figura 37A). El patrón electroforético del producto de amplificación del exón 12 del paciente mostró dos bandas de mayor movilidad que las obtenidas en el control, sugiriendo la posibilidad de alguna diferencia estructural en este fragmento. En los padres y abuelo se observaron los patrones del paciente y del control solapados, hecho que indica probablemente su condición heterocigota para el posible defecto genético del paciente.

La secuenciación del exón 12 de GPIIb mostró la existencia de una transición homocigota $G \rightarrow A$ en la posición 1063 del cDNA de GPIIb del paciente (Figura 37B). El resultado predecible de esta mutación sería la sustitución del glutamato en posición 324 (324E) por una lisina (324K). La secuencia del exón 12 de los padres demostró la presencia en la posición 1063 de dos bases, G y A, confirmando su condición heterocigota para esta mutación.

La mutación $G^{1063} \rightarrow A$ de GPIIb genera un nuevo sitio de restricción Msc I, hecho que sirvió para verificar la condición de portadores en los miembros de esta familia y para el análisis de una serie de individuos normales utilizados como control. Como se muestra en la figura 38, el fragmento de 333 pb de la amplificación del exón 12 no se corta por digestión con Msc I en los controles, mientras que en el paciente se generan dos fragmentos de 226 y 107 pb. En los miembros heterocigotos de la familia se observa un patrón de digestión correspondiente a alelos normales y mutados simultáneamente. En ninguno de los controles estudiados se observó la presencia de un sitio Msc I en esta posición, lo que indica que la mutación hallada en el paciente no es un polimorfismo.

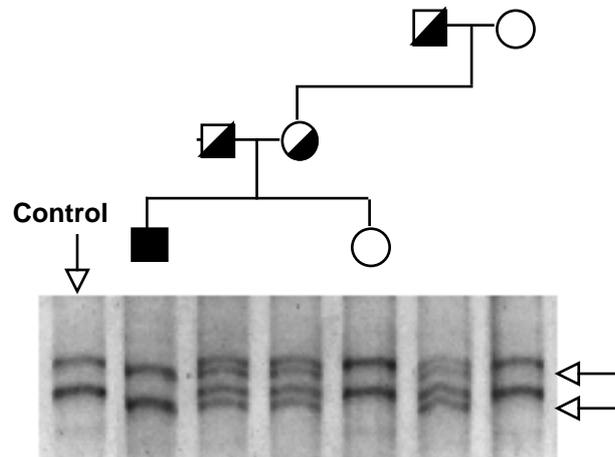
4.2.3.4. Cuantificación de RNAm de GPIIb y GPIIIa

Al no haber sido posible la detección de la subunidad GPIIb en las plaquetas del paciente, nos planteamos el estudio del RNAm para determinar en primer lugar si la mutación $G^{1063} \rightarrow A$ encontrada en el gen GPIIb afecta de algún modo a los niveles de su mensajero. La cuantificación del RNAm de GPIIb y GPIIIa en plaquetas del paciente, familiares y controles, se realiza mediante RT-PCR con sondas TaqMan

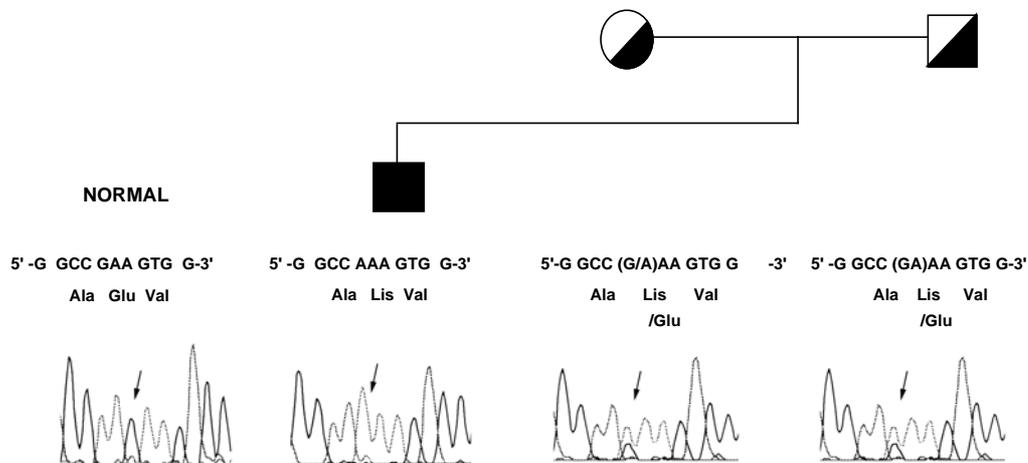
Figura 37

IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN G¹⁰⁶³→A EN EL EXÓN 12 DE GPIIb DE UN PACIENTE DE TROMBOASTENIA DE GLANZMANN

A



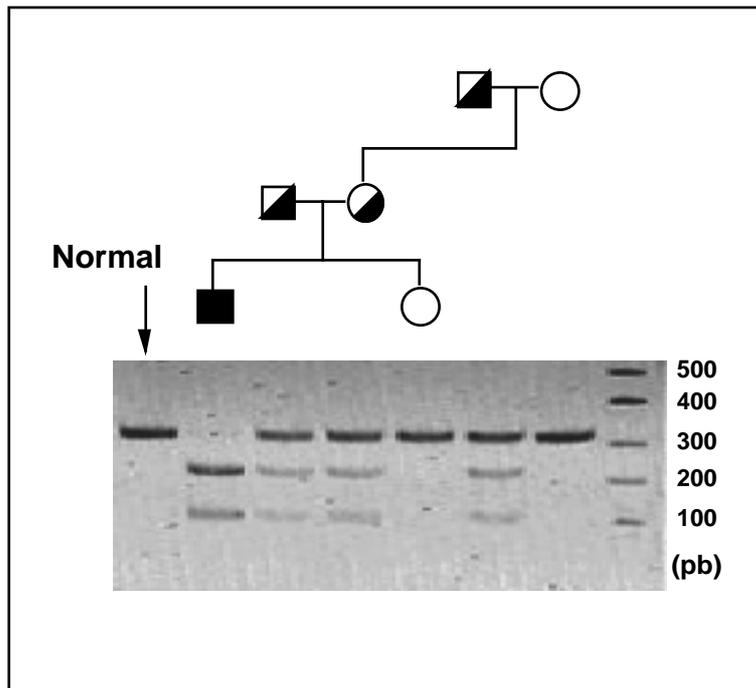
B



(A) Un fragmento de DNA de 333 pb que comprende el exón 12 de GPIIb se amplificó a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos: 5'-CAATATACCCCTGGTCC AGT-3' y 5'- CTCAGGCCAACTCCATGCTT-3'. Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis a 15°C en acrilamida al 12%. Las bandas correspondientes al DNA monocatenario se visualizaron por tinción con nitrato de plata. Las flechas señalan bandas presentes en el paciente y familiares portadores y ausentes en el control.

(B) Los productos de amplificación de este mismo fragmento se clonan en un vector T y se determina la secuencia de nucleótidos de una mezcla de 10 clones con un secuenciador de DNA modelo ABIprism 377 de Perkin-Elmer Cetus. La figura muestra los cromatogramas correspondientes a fragmentos de secuencia que comprenden los nucleótidos 1059 a 1069 que codifican los aminoácidos 323 a 325 de GPIIb. Las flechas señalan la transversión G¹⁰⁶³→A que genera el cambio E324K.

Figura 38

ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL EXÓN 12 DE GPIIb EN LA FAMILIA PORTADORA DE LA MUTACIÓN G¹⁰⁶³→A

Un fragmento de DNA de 333 pb que incluye el exón 12 de GPIIb fue amplificado a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos intrónicos: 5'-CAATATACCCCTGGTCCAGT-3' y 5'-CTCAGGCCAACTCCATGCTT-3'. Los productos de amplificación fueron digeridos con Msc I y resueltos en un gel de acrilamida al 8%. La digestión del alelo mutante produce fragmentos de 226 y 107 pb, mientras que el alelo normal no se digiere.

como se describe en el apartado de Métodos. Según los resultados recogidos en la Tabla VIII, el paciente y demás miembros de su familia poseen niveles de RNAm de GPIIb y GPIIIa similares a los obtenidos para un grupo de individuos control. Estos resultados descartan la posibilidad de que la falta de expresión de complejos GPIIb/IIIa en el paciente sea debida a una alteración de la tasa de transcripción y/o inestabilidad del RNAm de la forma mutada de GPIIb.

4.2.3.5. Análisis de pulso y caza para estudiar la síntesis de complejos [324K]GPIIb/IIIa en células CHO

Dado que los niveles del RNA mensajero de GPIIb y GPIIIa en el paciente se encuentran dentro de los límites normales, consideramos dos posibilidades para explicar la ausencia de complejos GPIIb/IIIa en plaquetas: la primera, que la proteína [324K]GPIIb fuera incapaz de formar heterodímeros con GPIIIa y, en segundo lugar, que los complejos [324K]GPIIb/IIIa fueran muy inestables. Para investigar estas posibilidades, se realizó un análisis de pulso y caza con células CHO que expresan establemente GPIIIa y GPIIb normal ([324E]GPIIb) o [324K]GPIIb mutante. Las proteínas sintetizadas *de novo* por estas células se marcan con [³⁵S]-metionina durante un pulso de media hora y después las células se incuban durante distintos tiempos con metionina sin marcar antes de su lisis y posterior inmunoprecipitación con anti-GPIIb o anti-GPIIIa. Si la proteína precursora proGPIIb no se asocia con GPIIIa, ésta no es capaz de continuar su tránsito hasta el aparato de Golgi donde sufre su procesamiento proteolítico y maduración final. Como se puede observar en la figura 39, la inmunoprecipitación de las células que expresan GPIIIa y GPIIb normal muestra un incremento progresivo a lo largo del tiempo de las bandas correspondientes a GPIIIa y GPIIb madura, inmunoprecipitándose ambas subunidades tanto con anti-GPIIb como con anti-GPIIIa. Sin embargo, proGPIIb sólo se detecta al utilizar anti-GPIIb y su intensidad va disminuyendo con el tiempo de manera recíproca a la aparición creciente de GPIIb. En el caso de las células CHO que expresan [324K]GPIIb y GPIIIa normal, se observa que el anticuerpo anti-GPIIb sólo precipita proGPIIb, cuya intensidad disminuye en función del tiempo, mientras que anti-GPIIIa sólo precipita GPIIIa que se incrementa progresivamente a lo largo del tiempo. Estos resultados parecen indicar que la forma pro[324K]GPIIb es incapaz de heterodimerizar con GPIIIa y continuar su tránsito intracelular hasta la superficie.

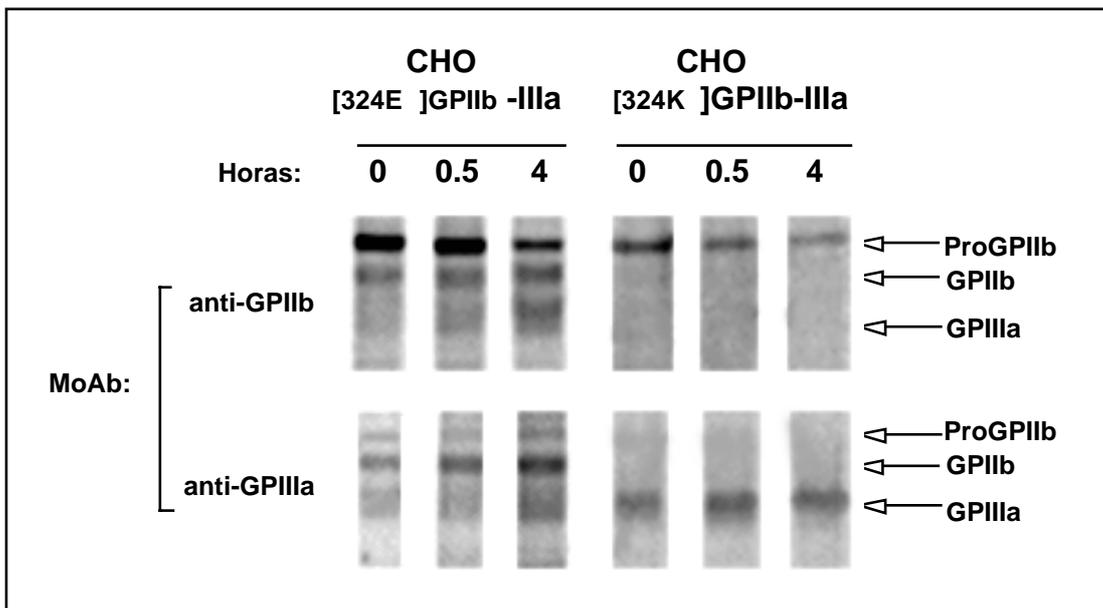
Tabla VIII
Cuantificación del RNAm de GPIIb y GPIIIa en una familia portadora de la mutación [324K]GPIIb

	Paciente	Padre	Madre	Hermana	Abuelo	Abuela	Control (n=7)
GPIIb							
RNAm	5.2	5.3	3.2	3.3	4.2	3.1	2.5-4.7
Expresión en superficie	1.7	15.7	15.1	22.5	16.1	25.1	22.7-29
GPIIIa							
RNAm	10.9	14.9	16.7	14.7	10.7	15.3	9.0-16.9
Expresión en superficie	1.6	19.6	22.1	30.4	20.2	37.7	28.2-36.8

Los niveles de RNAm vienen expresados en unidades arbitrarias como el cociente ΔRQ -GPIIb (o GPIIIa)/ ΔRQ - β -actina, obtenidos de la cuantificación de mensajeros por el sistema TaqMan mediante RT-PCR como se describe en Métodos. La expresión en superficie es el valor del canal medio de fluorescencia obtenido en el análisis de las plaquetas mediante citometría con anticuerpos anti-GPIIb o anti-GPIIIa.

Figura 39

**ANÁLISIS DE PULSO Y CAZA DE LA ESTABILIDAD DE COMPLEJOS
[324K]GPIIb/IIIa EN CÉLULAS CHO**



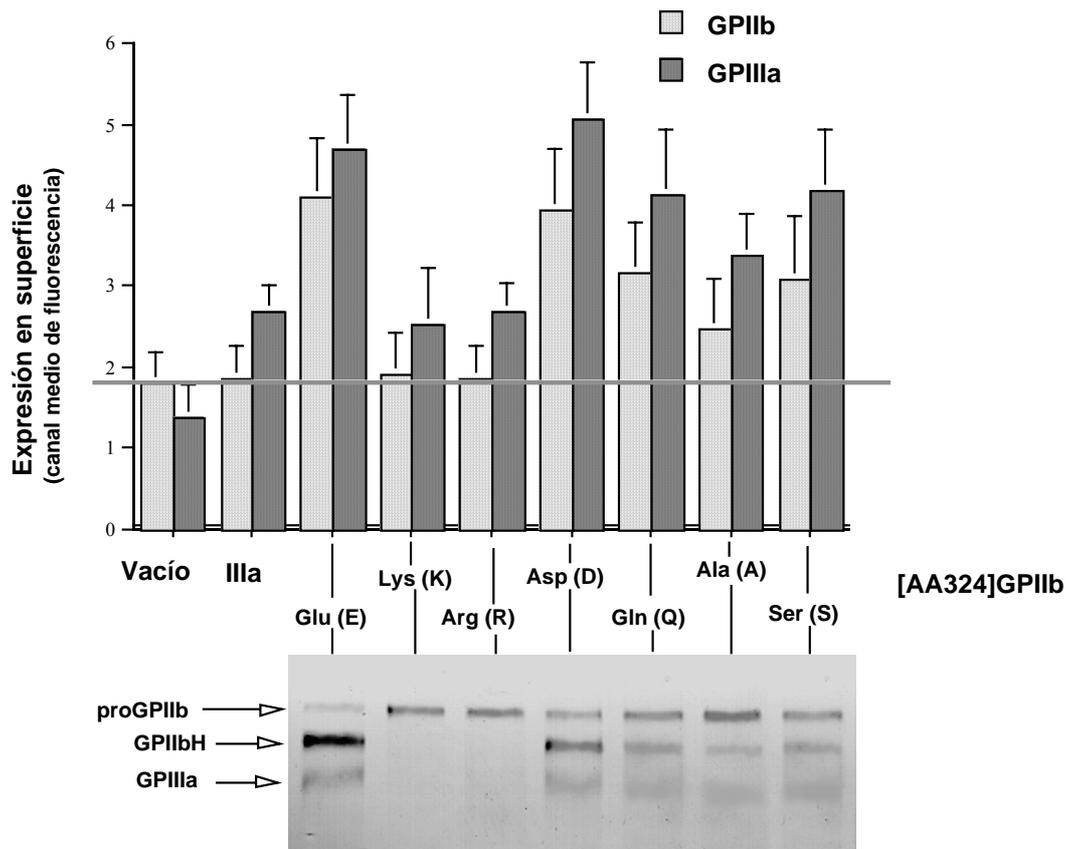
Células CHO que expresan establemente GPIIIa y GPIIb normal (324E) o GPIIb mutante (324K) se marcan con [^{35}S]-metionina durante un pulso de media hora y después se incuban durante los tiempos indicados con metionina sin marcar antes de su lisis y posterior inmunoprecipitación con anti-GPIIb y anti-GPIIIa, como se describe en Métodos.

4.2.3.6. Mutagénesis del residuo 324 de GPIIb

La mutación G¹⁰⁶³→A de GPIIb da lugar a la sustitución del glutamato en posición 324 por una lisina (E324K). Según los resultados expuestos, esta sustitución impide la heterodimerización normal de las subunidades y por ello, es responsable de la ausencia de GPIIb/IIIa en las plaquetas del paciente. Sin embargo, queda por aclarar si es la falta de glutamato o la presencia de una lisina, la causa de esta disfunción. Para resolver esta cuestión, se generan una serie de formas mutadas de GPIIb con diferentes sustituciones en el residuo 324 de la proteína. Estas formas de GPIIb son transfectadas junto con GPIIIa en células CHO para estudiar su capacidad de dimerización y expresión en superficie mediante análisis de inmunoprecipitación y citometría de flujo. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 40, donde las barras del panel superior representan los niveles relativos de GPIIb y GPIIIa en la superficie de las células según los datos obtenidos mediante citometría. La sustitución de 324E por un residuo de carga positiva distinto a lisina, como arginina, produjo un efecto similar al obtenido con la mutación hallada en el paciente, al impedir la expresión en superficie de GPIIb/IIIa. Sin embargo, la sustitución de 324E por otro residuo cargado negativamente, como aspartato, no altera en modo alguno la expresión de complejos, sugiriendo que la existencia de una carga negativa en esta posición parece ser esencial. Aminoácidos polares no cargados, como glutamina y serina, o residuos no polares como alanina, permiten también la expresión superficial de GPIIb/IIIa, aunque menos eficientemente. Los lisados de células transfectadas con estas distintas formas de GPIIb se inmunoprecipitan con anti-GPIIb (Figura 40, panel inferior), observándose, que en los casos en que está impedida la expresión en superficie de GPIIb/IIIa, sólo se detecta una banda que corresponde a proGPIIb. En todos los demás casos se lograron inmunoprecipitar complejos GPIIb/IIIa en cantidades aparentemente proporcionales a los valores obtenidos mediante citometría de flujo.

Figura 40

EFFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DEL RESIDUO 324 DE GPIIb EN LA SÍNTESIS Y EXPRESIÓN DE COMPLEJOS GPIIb/IIIa



Células CHO son transfectadas de forma transitoria con cDNAs que codifican GPIIIa normal y [324E]GPIIb normal o [324K]GPIIb, [324R]GPIIb, [324D]GPIIb, [324Q]GPIIb, [324A]GPIIb, [324S]GPIIb mutantes. A las 48 horas después de la transfección, las células son analizadas mediante citometría (panel superior) con anticuerpos monoclonales específicos contra GPIIb o GPIIIa y procesadas como se describe en la sección de Métodos. Las barras marcadas como vacío o IIIa representan los valores de células transfectadas con el vector vacío o sólo con el cDNA de GPIIIa, respectivamente. La figura representa la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SD. En el panel inferior se muestra la inmunoprecipitación realizada con anti-GPIIb a partir de lisados totales marcados con biotina de células CHO igualmente transfectadas.

4.3. FENOTIPO TROMBOASTÉNICO CON EXPRESIÓN NORMAL DE GPIIb/IIIa (“VARIANTE”)

En uno de los casos estudiados, el paciente había sido diagnosticado de tromboastenia de Glanzmann en base a los datos clínicos que reflejaban una ausencia total de agregación plaquetaria en respuesta a distintos agonistas fisiológicos. Sin embargo, la expresión de GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas del paciente, analizadas mediante citometría, resultó ser normal. Aunque los niveles del receptor no se ven afectados, cabría la posibilidad de que existiera alguna mutación en GPIIb y/o GPIIIa que provocara algún defecto funcional. Para estudiar esta posibilidad, se secuenció el cDNA completo de GPIIb y GPIIIa obtenido a partir del RNA de las plaquetas del enfermo y no se halló ningún cambio estructural capaz de explicar la disfunción del receptor. También se investigó la existencia de mutaciones en fragmentos de DNA genómico mediante el análisis de SSCP-PCR y tampoco se observó ninguna anomalía. Según estos resultados, el fenotipo tromboasténico del paciente no es debido a mutaciones o alteraciones en el complejo GPIIb/IIIa. Por ello, parece probable que la ausencia de agregación plaquetaria esté provocada por un defecto en alguno de los componentes del proceso de señalización intracelular que regula la activación del receptor.

4.4. PAPEL DE LA REGIÓN CARBOXI-TERMINAL DE GPIIIa EN LA TASA DE EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR DE FIBRINÓGENO

Nuestro interés por el papel de la región carboxi-terminal de GPIIIa proviene de las observaciones obtenidas del estudio de un caso de tromboastenia de Glanzmann tipo I que posee una mutación homocigota G1846T en la región codificadora de GPIIIa que da lugar a la substitución del residuo Glu⁶¹⁶ por un codón prematuro de terminación (Ferrer *et al*, 1998). Esta mutación no afecta a la tasa de transcripción ni al procesamiento del RNA mensajero de GPIIIa, pero genera una proteína truncada (GPIIIa[Δ616]) que comprende sólo parte del dominio extracelular al carecer de 77 aminoácidos carboxi-terminales de la región extracelular (aa 616-692) y de los dominios transmembranar (aa 693-721) y citosólico (aa 722-762). Mediante experimentos de transfección en células CHO se observó que esta forma truncada de GPIIIa no era capaz de formar heterodímeros con GPIIb y expresarse en superficie.

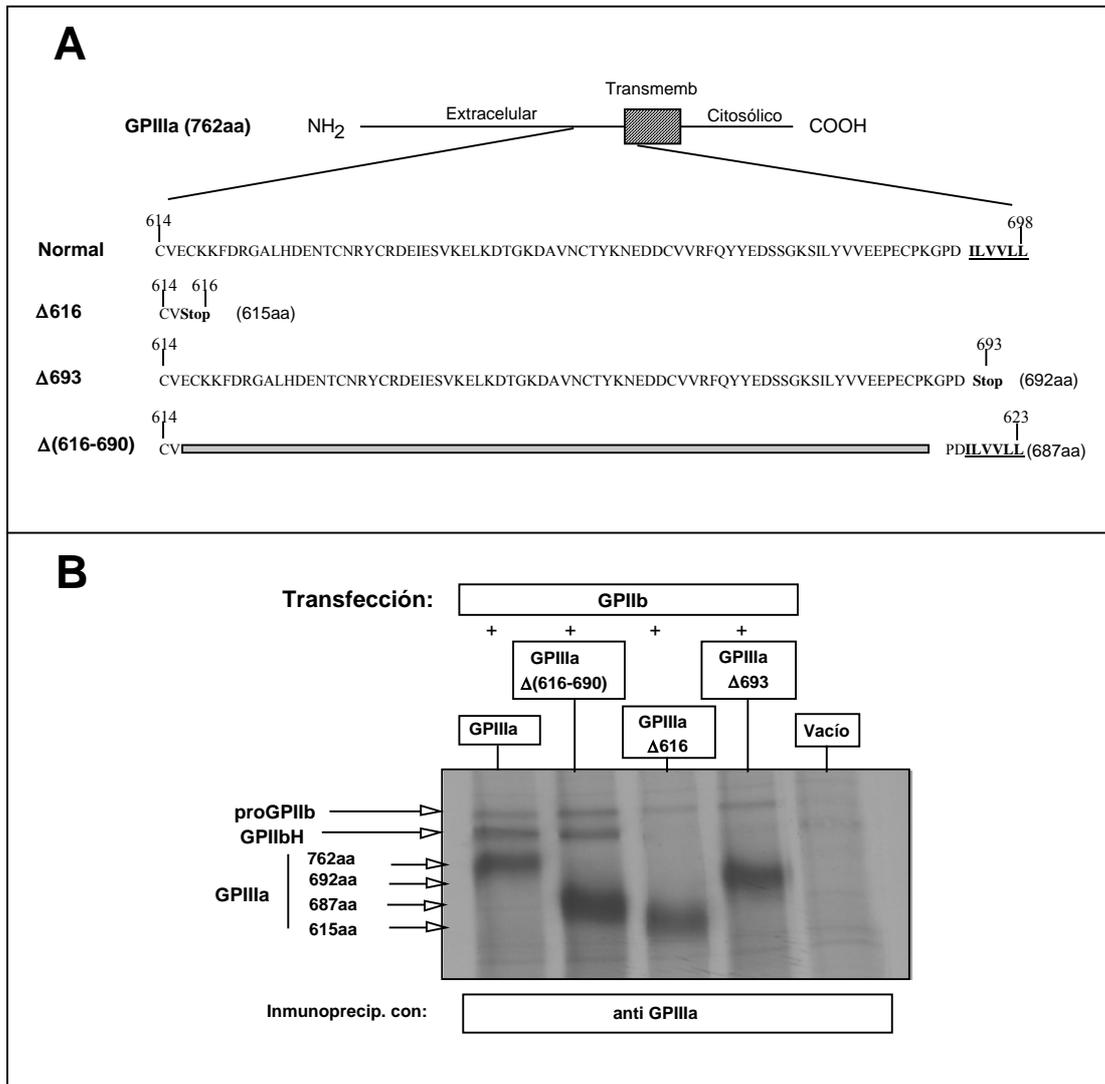
Por tanto, consideramos de interés estudiar qué región de GPIIIa, ausente en esta proteína truncada, es esencial para la formación y expresión superficial de heterodímeros GPIIb/IIIa. Para ello, además de la forma truncada GPIIIa[Δ616] presente en el paciente tromboasténico, creamos mediante mutagénesis por PCR otras formas recombinantes de GPIIIa (Figura 41, panel A): En el caso de GPIIIa[Δ693], introdujimos un codón de terminación en sustitución del residuo I 693, obteniendo de este modo un cDNA mutado que codifica para la totalidad de la región extracelular de GPIIIa pero que carece de los dominios transmembranar y citosólico. La construcción GPIIIa-Δ(616-690) posee una delección interna de 75 aminoácidos que corresponden al extremo carboxi-terminal de la zona extracelular, pero a diferencia de GPIIIa[Δ616], esta nueva forma mutada recupera las porciones transmembranar y citosólica de GPIIIa.

4.4.1. Estudio de la formación de complejos GPIIb/IIIa normales y mutantes

Para examinar qué regiones de GPIIIa son esenciales para la síntesis y ensamblaje de complejos GPIIb/IIIa, expresamos de manera transitoria las subunidades normal o mutadas de GPIIIa junto con la subunidad GPIIb en células CHO. Las proteínas sintetizadas por estas células se marcaron con [³⁵S]-metionina durante 3 horas y después se analizó la presencia de complejos GPIIb/IIIa en los lisados celulares mediante inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales específicos para GPIIIa o GPIIb. En el panel B de la figura 41 se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizó anti-GPIIIa. En todos los casos fuimos capaces de detectar una banda cuyo peso molecular coincidía con el que cabría esperar para cada una de las formas mutadas de GPIIIa; sin embargo, sólo se observa una correcta heterodimerización y posterior maduración hasta la obtención de complejos maduros GPIIb/IIIa en las células transfectadas con GPIIIa normal o con GPIIIa-Δ(616-693). Todo lo contrario ocurre en las células transfectadas con las formas truncadas GPIIIa[Δ616] y GPIIIa[Δ693]. En estos casos, se observa escasa formación de heterodímeros con proGPIIb y ausencia total de la cadena pesada de GPIIb madura, indicando que estas subunidades GPIIIa truncadas no permiten una eficiente formación y expresión superficial de complejos GPIIb/ΔGPIIIa. Cuando se inmunoprecipita con anti-GPIIb (resultados no mostrados) se detecta una gran cantidad de proGPIIb libre en todos los

Figura 41

MUTACIONES DE LA REGIÓN CARBOXI-TERMINAL DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE GPIIIa Y SU EFECTO EN LA SÍNTESIS DE COMPLEJOS GPIIb/IIIa



(A) Esquema de la región carboxi-terminal del dominio extracelular de las proteínas GPIIIa mutantes. Comparación de los residuos 614 al 698 de GPIIIa normal con los residuos homólogos de las distintas formas mutantes generadas, indicando (entre paréntesis) el número total de aminoácidos de cada una de las proteínas resultantes. Los residuos subrayados pertenecen al dominio transmembranar de GPIIIa.

(B) Células CHO transfectadas de forma transitoria con los cDNAs de GPIIb normal y GPIIIa normal, GPIIIa[Δ616], GPIIIa[Δ693] o GPIIIa-Δ(616-690) se incuban con [³⁵S]-metionina durante 3 horas antes de su lisis y posterior inmunoprecipitación con anti-GPIIIa, como se describe en Métodos. El blanco o “vacío” corresponde a la inmunoprecipitación de células transfectadas únicamente con el plásmido de expresión pcDNA3.

casos, lo que sugiere que la formación de heterodímeros no está limitada por la disponibilidad de proGPIIb. Al igual que observamos con anti-GPIIIa, con la utilización de anti-GPIIb sólo se obtuvieron cantidades detectables de complejos maduros cuando se cotransfectan GPIIb y GPIIIa normales o la forma deletada de GPIIIa- $\Delta(616-690)$. Según estos resultados, la presencia de los dominios transmembranar y citosólico son esenciales para el ensamblaje y expresión superficial de GPIIb/IIIa, pero la ausencia de los residuos 616 al 693 de la región extracelular no impide la formación y expresión de complejos con GPIIb.

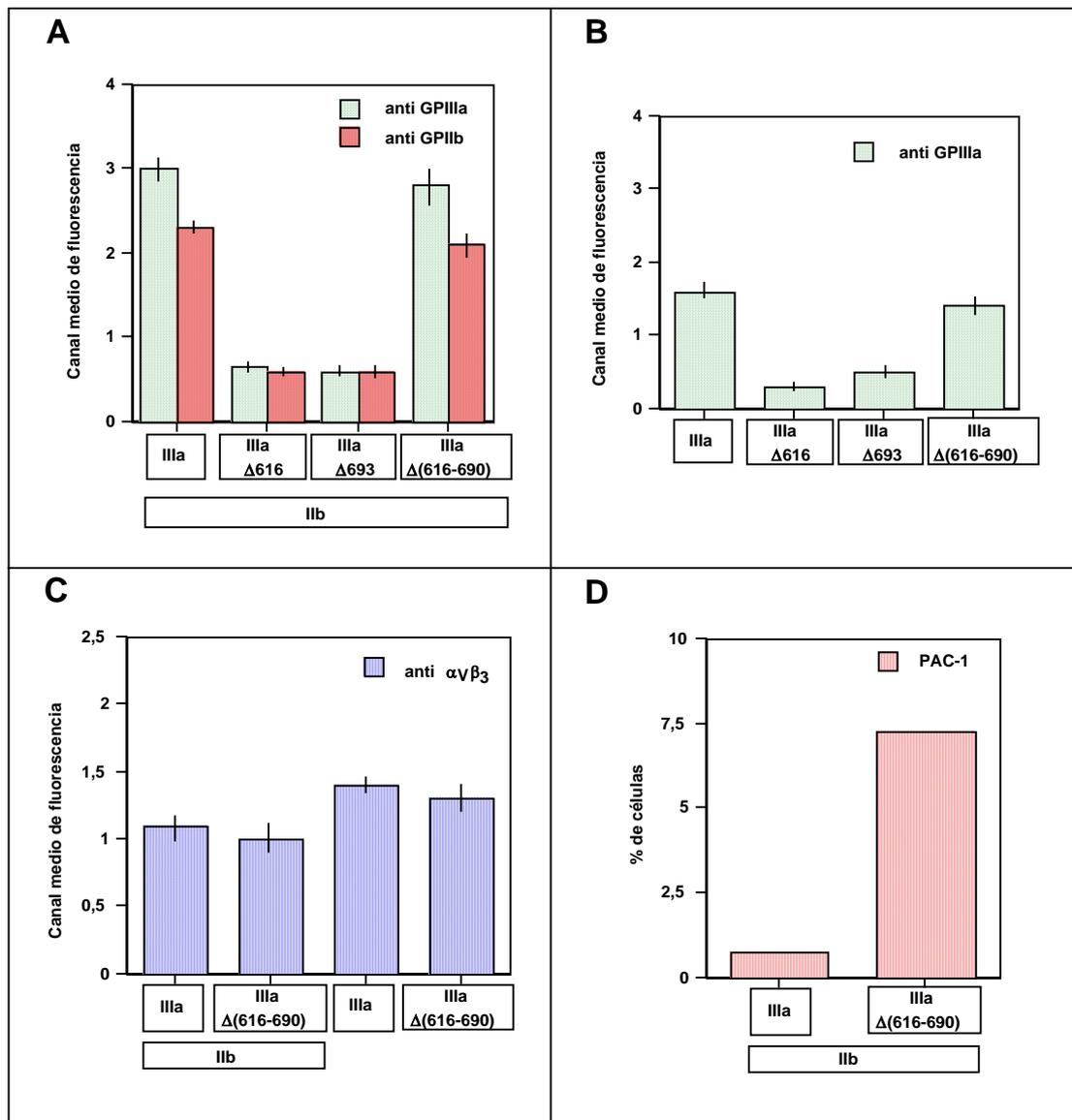
4.4.2. Análisis de la expresión superficial de las formas mutantes de GPIIIa mediante citometría de flujo

Para determinar si los resultados obtenidos mediante inmunoprecipitación concuerdan con el grado de expresión superficial de los complejos GPIIb/IIIa, se analizaron mediante citometría de flujo células CHO transfectadas transitoriamente con GPIIb y las distintas formas de GPIIIa. Los valores obtenidos con anti-GPIIb o con anti-GPIIIa (Figura 42, panel A) demuestran que, de acuerdo con los datos anteriormente expuestos del análisis de inmunoprecipitación, la subunidad GPIIIa- $\Delta(616-690)$ es capaz de formar complejos con GPIIb y expresarse en superficie en cuantía similar a la mostrada por la subunidad GPIIIa normal. Contrariamente, las formas truncadas GPIIIa[$\Delta 616$] y GPIIIa[$\Delta 693$] no permiten una expresión superficial apreciable de complejos GPIIb/IIIa.

La subunidad GPIIIa, además de heterodimerizar con GPIIb, es capaz de formar complejos con subunidades α_v . Cuando las células CHO se transfectan únicamente con GPIIIa-cDNA, la proteína es capaz de llegar a la superficie celular asociada a subunidades α endógenas. Para estudiar si las formas mutadas de GPIIIa eran también capaces de expresarse en superficie en ausencia de la subunidad GPIIb, se transfectaron células CHO con los vectores de expresión de las distintas GPIIIa mutantes y se analizó su expresión en superficie con anti-GPIIIa mediante citometría de flujo (Figura 42, panel B). Los resultados mostraron que las formas truncadas GPIIIa[$\Delta 616$] y GPIIIa[$\Delta 693$] poseen una deficiente o ausente expresión superficial formando complejos tanto con GPIIb como con otras subunidades α . Sin embargo, la deleción $\Delta(616-690)$ de GPIIIa no altera ni la formación, ni la expresión superficial de complejos $\alpha_v\beta_3$, pues, como muestra el panel C de la figura 42, células transfectadas

Figura 42

EFFECTO DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN CARBOXI-TERMINAL DE GPIIIa EN LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE Y ACTIVACIÓN DE LOS COMPLEJOS GPIIb/IIIa Y $\alpha_v\beta_3$



(A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa en células CHO cotransfectadas de modo transitorio con los cDNAs de GPIIb y GPIIIa normal o GPIIIa mutadas. Se representan los canales medios de fluorescencia (unidades arbitrarias) obtenidos con los anticuerpos monoclonales anti-GPIIb o anti-GPIIIa en cada caso. (B) Células CHO transfectadas únicamente con la subunidad GPIIIa, normal o mutadas, se analizan mediante citometría con anti-GPIIIa, como se describe en Métodos. (C) Expresión en superficie de complejos $\alpha_v\beta_3$ en CHO transfectadas transitoriamente con o sin GPIIb y GPIIIa normal o GPIIIa- Δ (616-690). En los paneles (A), (B) y (C) se representa la media de tres experimentos junto a la desviación standard obtenida en cada caso. (D) Unión de PAC-1-FITC a células CHO transfectadas con GPIIb y GPIIIa normal o GPIIIa- Δ (616-690). Se indica el porcentaje de células que expresan complejos GPIIb/IIIa constitutivamente activos capaces de ser reconocidos por PAC-1.

con GPIIIa normal o GPIIIa- Δ (616-693) no presentan diferencias significativas en la presencia de complejos $\alpha_v\beta_3$ valorados mediante citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal específico para este complejo.

4.4.3. Análisis funcional del complejo GPIIb/IIIa- Δ (616-690)

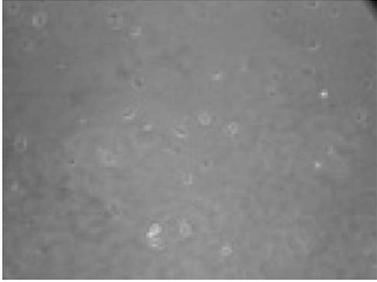
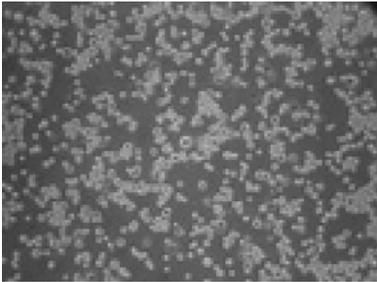
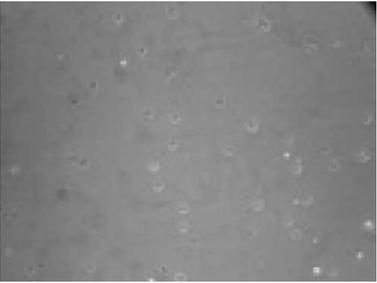
La delección GPIIIa- Δ (616-690) no alteraba la expresión superficial de GPIIb/IIIa pero era necesario evaluar si esta mutación daba lugar a alteraciones funcionales del receptor. Para ello, comenzamos transfectando células CHO con GPIIb y con GPIIIa normal o GPIIIa- Δ (616-690) y comparamos mediante citometría de flujo su capacidad para unir el moAb PAC-1, que reconoce exclusivamente la conformación activada de GPIIb/IIIa. Para confirmar la eficiencia de la transfección, las células se analizaron primero con anti-GPIIb. En las transfecciones transitorias realizadas tanto con GPIIIa normal como con GPIIIa- Δ (616-690), el porcentaje de células que expresaron GPIIb/IIIa en la superficie celular fue de, aproximadamente, el 20%. Al examinar estas mismas células con PAC-1 se vio (Figura 42, panel D) que el 7,5% de las células transfectadas con la subunidad GPIIIa- Δ (616-690) fijaban espontáneamente PAC-1, mientras que sólo un 0,7% de las células transfectadas con GPIIIa normal fueron reconocidas por este anticuerpo. Según estos resultados, la subunidad GPIIIa- Δ (616-690) confiere al receptor una conformación constitutivamente activa.

Para ver si el complejo GPIIb/IIIa- Δ (616-690) permite la fijación normal a fibrinógeno inmovilizado, realizamos ensayos de adhesión con células CHO que expresaban complejos GPIIb/IIIa normal o GPIIb/IIIa mutante. Las células se incubaron durante distintos tiempos en pocillos recubiertos con fibrinógeno y, después de eliminar mediante lavados las células no adheridas, se determinó al microscopio el número de células retenidas en la placa. Como puede verse en la figura 43, tanto las células que expresan complejos normales como las que poseen complejos mutantes se adhirieron al fibrinógeno inmovilizado, pero en el caso de las células CHO-GPIIb/IIIa- Δ (616-690) se observó una mayor eficiencia. Como control de la especificidad de esta unión se muestra que cuando las células fueron incubadas en pocillos tratados con albúmina sérica bovina (BSA), no se observó adhesión.

Las células CHO transfectadas con GPIIb y GPIIIa normal expresan una forma inactiva del heterodímero que permite la adhesión específica de las células a fibrinógeno inmovilizado pero que necesita adoptar una conformación “activa” para

Figura 43

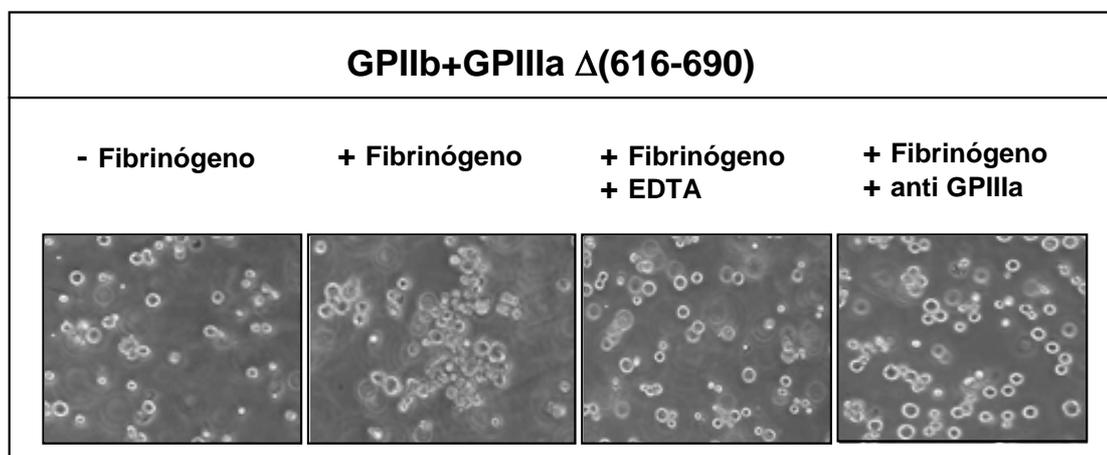
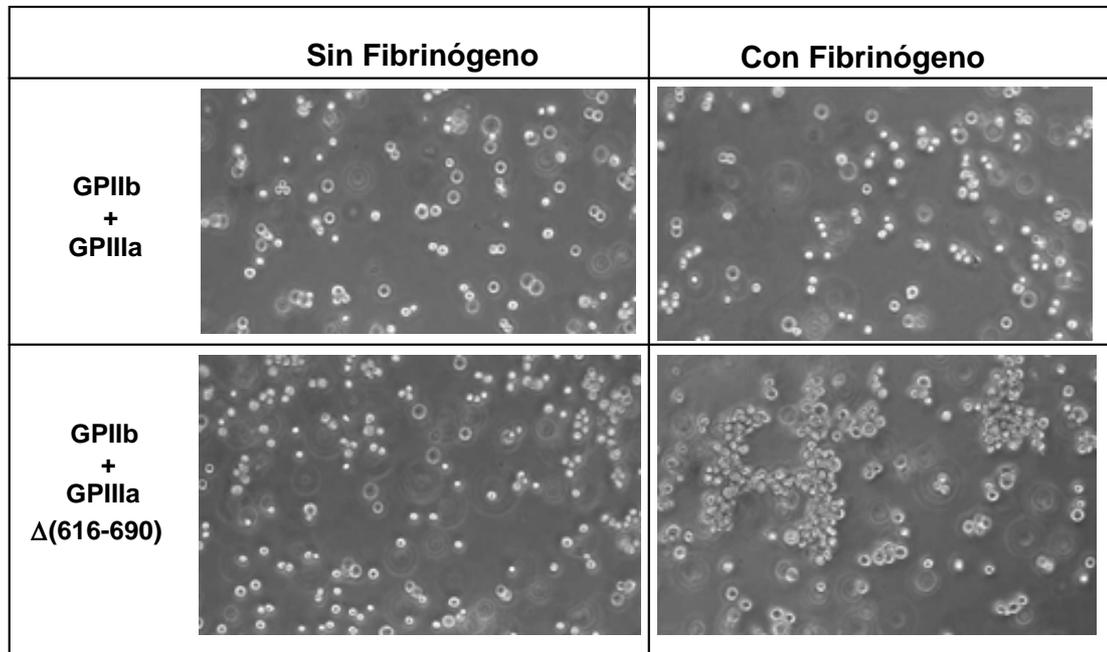
**ADHESIÓN A FIBRINÓGENO INMOVILIZADO DE CÉLULAS CHO
TRANSFECTADAS CON GPIIb Y GPIIIa- Δ (616-690)**

	Albúmina	Fibrinógeno
Blanco		
GPIIb+GPIIIa		
GPIIb+GPIIIa Δ (616-690)		

Células CHO transfectadas con el plásmido pcDNA3 vacío (blanco) o con los cDNAs de GPIIb y GPIIIa normal o GPIIIa- Δ (616-690) se lavan y se depositan en pocillos recubiertos con BSA o fibrinógeno como se describe en Métodos. Después de 15 minutos, las células adheridas se fotografian a través de un microscopio de contraste de fase (x 80). Las fotografías que se muestran son representativas de los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes.

Figura 44

**ENSAYOS DE AGREGACIÓN CON CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS
CON GPIIb Y GPIIIa-Δ(616-690)**



Panel superior: Células CHO transfectadas con GPIIb y GPIIIa normal o GPIIIa-Δ(616-690) se incuban en ausencia o presencia de fibrinógeno (1mg/ml) durante 15 minutos. La formación de agregados se visualiza con un microscopio de contraste de fase. Panel inferior: En algunos casos las células transfectadas con GPIIb y GPIIIa-Δ(616-690) se tratan con 10μg de anti-GPIIIa (P37) o 10mM EDTA antes de la adición del fibrinógeno. Las fotografías que se muestran son representativas de tres experimentos independientes (x160).

poder fijar fibrinógeno soluble. Como la unión de fibrinógeno al complejo GPIIb/IIIa activado provoca agregación celular, examinamos la capacidad de células cotransfectadas con GPIIb y GPIIIa normal o GPIIIa- $\Delta(616-690)$ para agregarse en presencia de fibrinógeno. Como se observa en la figura 44 (panel superior), la adición de fibrinógeno a las células CHO-IIb/IIIa no provocó la formación de agregados, lo que indica que el receptor se encuentra en estado inactivo, o de baja afinidad por su ligando. Sin embargo, las células CHO-IIb/IIIa- $\Delta(616-690)$ presentaron agregación dependiente de fibrinógeno en ausencia de activadores. Estos resultados indican que el receptor mutado está en un estado constitutivamente activo capaz de promover agregación celular sólo con la presencia de fibrinógeno. Esta agregación es dependiente de cationes divalentes como Ca^{2+} , pues no se produce cuando las células se resuspenden en un medio con agentes quelantes de Ca^{2+} como EDTA (Figura 44, panel inferior). El anticuerpo P37 (anti-GPIIIa) bloqueó el complejo GPIIb/IIIa e inhibió la agregación. Esta observación confirma que la agregación celular estaría mediada específicamente por este receptor. Las observaciones anteriores indican que los residuos delecionados de la subunidad GPIIIa- $\Delta(616-690)$ están implicados en el control de la afinidad del receptor de fibrinógeno por su ligando.

4.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DEL RECEPTOR DE FIBRINÓGENO

4.5.1. Relación entre disponibilidad de RNAm y expresión en superficie de GPIIb y GPIIIa en plaquetas

La expresión en superficie de GPIIb/IIIa es un proceso complejo en el que intervienen múltiples etapas: síntesis de subunidades, ensamblaje, acabado postraduccional, tráfico intracelular e inserción en la membrana plasmática. Individuos heterocigotos para determinadas mutaciones en GPIIb o GPIIIa presentan niveles plaquetarios de GPIIb/IIIa que oscilan entre el 40 y el 60% de los valores normales. Esta observación sugiere que la disponibilidad de RNA mensajero podría ser la etapa limitante para la expresión superficial de heterodímeros GPIIb/IIIa. Para aclarar esta cuestión, estudiamos la relación entre los niveles de RNAm de GPIIb y GPIIIa y la tasa de expresión en superficie del receptor GPIIb/IIIa. Para ver la correlación RNAm-proteína realizamos un estudio en una población de individuos sanos (sin anomalías hematológicas). El contenido plaquetario de receptor de

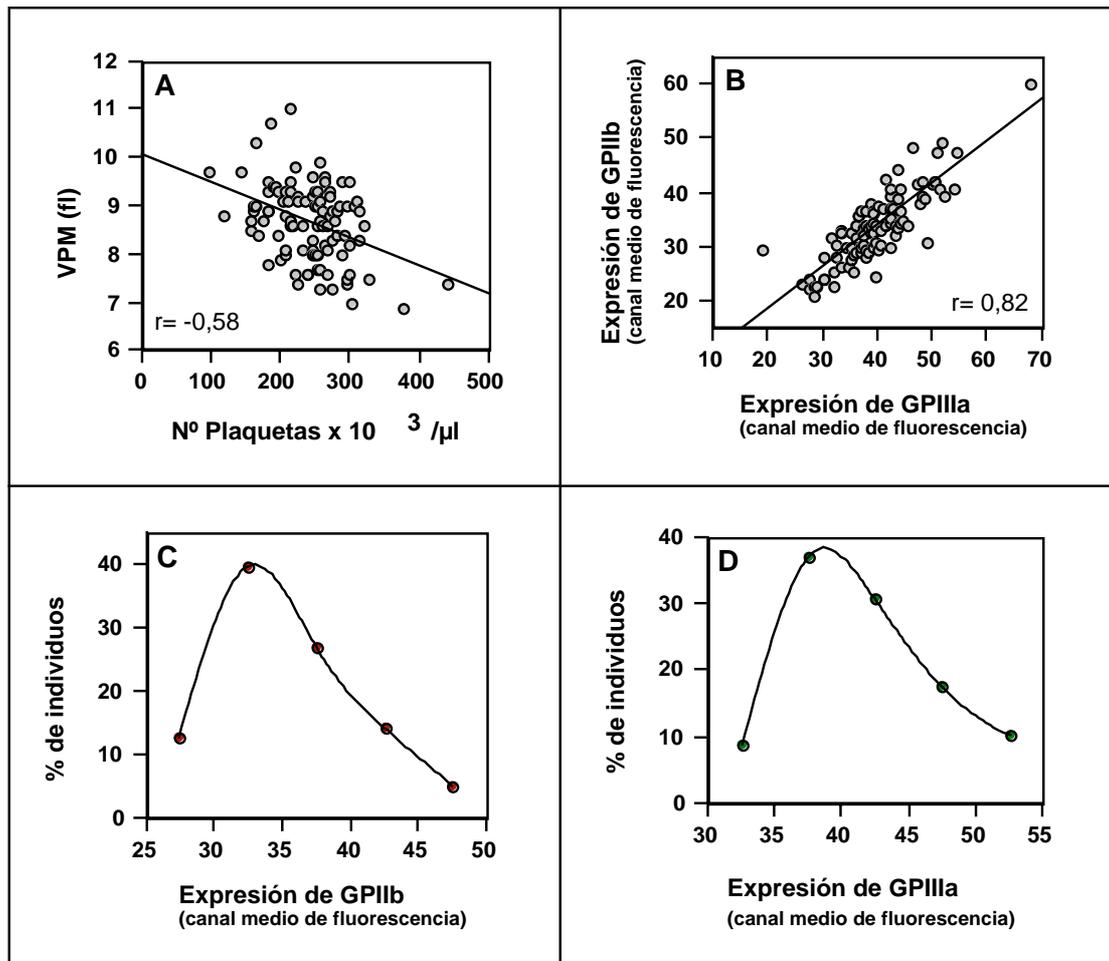
fibrinógeno lo medimos mediante citometría de flujo y los niveles de RNAm por RT-PCR cuantitativo (TaqMan), según hemos descrito anteriormente.

En primer lugar tratamos de determinar la variabilidad en la expresión del complejo GPIIb/IIIa en una población de individuos normales, para lo cual obtuvimos sangre de 100 donantes voluntarios habituales, previo informe consentido. Se determinó el número de plaquetas y el volumen plaquetario medio (VPM) para cada individuo, observándose una relación inversa entre ambos parámetros (coeficiente de correlación, $r = -0,58$) (Figura 45 A). En las mismas muestras se midió mediante citometría de flujo el contenido plaquetario de GPIIb y GPIIIa en la superficie celular. Los valores obtenidos para ambas glucoproteínas presentan una distribución gaussiana (Figura 45, paneles C y D), pudiendo observarse en la población control estudiada un rango de variabilidad moderado. El grado de expresión de GPIIb es directamente proporcional al de GPIIIa ($r = 0,82$) (Figura 45 B), como es de esperar entre dos proteínas que se encuentran en la superficie plaquetaria formando heterodímeros.

Para la determinación del RNA mensajero, se extrajo RNA total de las plaquetas de los individuos anteriormente estudiados y los niveles de RNAs mensajeros de GPIIb, GPIIIa y β -Actina se obtuvieron por RT-PCR con sondas fluorescentes TaqMan específicas y en las condiciones experimentales apropiadas para cada caso. Los valores de RNAm de GPIIb y GPIIIa se corrigen con los de β -actina, para eliminar las diferencias debidas a la cantidad o calidad del RNA de partida usado en la reacción de RT-PCR. La figura 46 muestra la correlación encontrada entre los niveles expresados en superficie de GPIIb/IIIa y el contenido plaquetario de RNAm. Para eliminar fluctuaciones debidas a diferencias del tamaño plaquetario entre individuos, se usan los valores medios de dispersión lateral "forward scatter" (FS), parámetro indicativo del tamaño celular en el citómetro de flujo, para corregir los valores obtenidos de GPIIb y GPIIIa. Los datos indican que existe una correlación positiva entre los niveles de RNAm de GPIIb y su expresión superficial (coeficiente de correlación $r = 0,68$), mientras que para GPIIIa es probable que no sea así, porque presenta un índice de correlación inferior a 0,5 ($r = 0,43$). Estas observaciones parecen indicar que las variaciones en la expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa son función en gran medida de la disponibilidad de RNAs mensajeros, por lo que la tasa de transcripción de los genes de GPIIb y GPIIIa, de forma más evidente la de GPIIb,

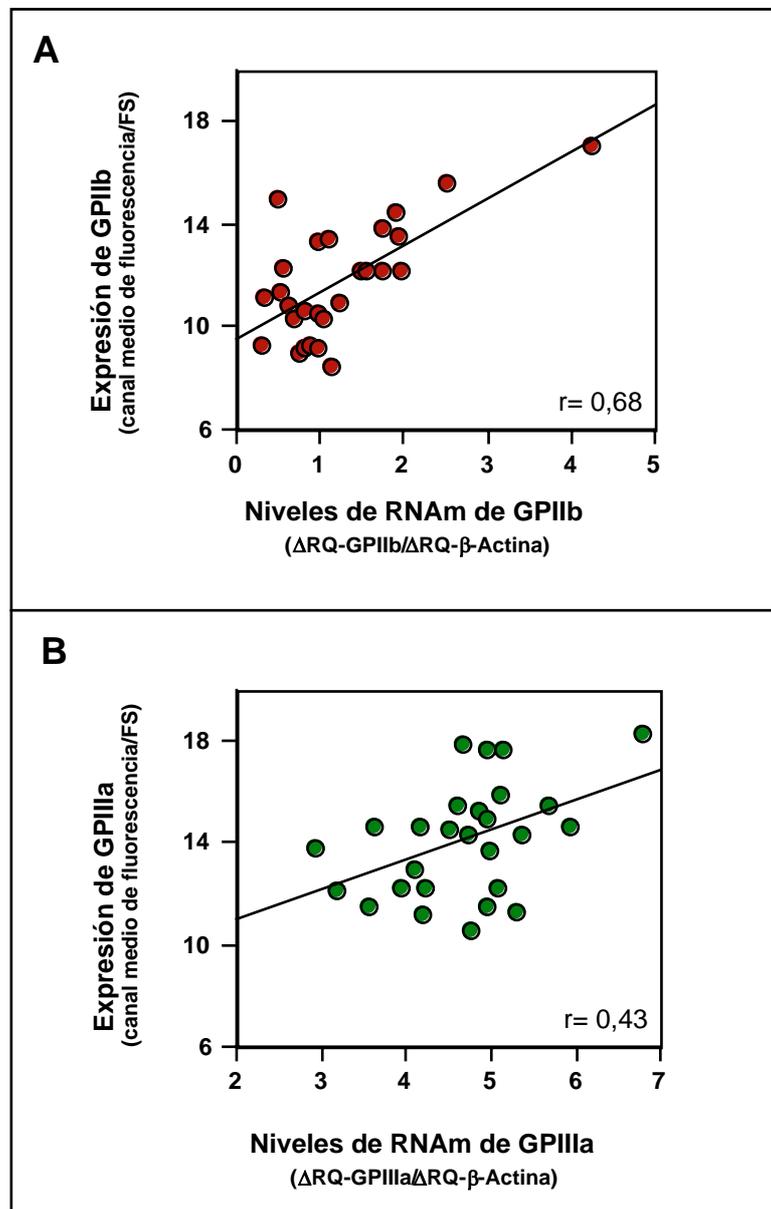
Figura 45

EXPRESIÓN DE GPIIb Y GPIIIa EN LA SUPERFICIE PLAQUETARIA DE UNA POBLACIÓN DE INDIVIDUOS SANOS



Se recogen muestras de sangre de 100 voluntarios para el estudio de la variabilidad de expresión de GPIIb/IIIa en una población control. (A) Relación entre el número de plaquetas y el volumen plaquetario medio (VPM) de cada individuo. Ambos parámetros se obtuvieron mediante técnicas convencionales de análisis clínico. La relación entre variables independientes se calcula por el coeficiente de Pearson (r) con el programa DeltaGraph Professional versión 2.0. (B) Relación entre la expresión en superficie de GPIIb y GPIIIa. Plaquetas lavadas de cada individuo son incubadas con anticuerpos específicos, anti-GPIIb y anti-GPIIIa, y analizadas mediante citometría de flujo como se describe en el apartado de Métodos. El canal medio de fluorescencia (unidades arbitrarias convertidas a escala lineal) será la medida de la cantidad de anticuerpo unido en cada caso. (C) y (D) Distribución del grado de expresión de GPIIb y GPIIIa en las plaquetas de la población estudiada.

Figura 46

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE RNAm Y LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE GPIIb Y GPIIIa EN PLAQUETAS

Se extrae RNA total de plaquetas de una serie de individuos control en los que paralelamente se determinan, por citometría de flujo, los niveles de GPIIb y GPIIIa en la superficie plaquetaria. Los niveles de RNAm de GPIIb, GPIIIa y β -Actina se miden por RT-PCR con sondas TaqMan, tal como se describe en Métodos. Las gráficas representan los niveles de RNAm de GPIIb (Panel A) y GPIIIa (Panel B), normalizados por β -Actina, frente al grado de expresión de cada subunidad en la superficie plaquetaria de los individuos analizados. El canal medio de fluorescencia obtenido mediante citometría (unidades arbitrarias convertidas a escala lineal) se corrige con los valores de "forward scatter" (FS) para eliminar diferencias debidas a variaciones en el tamaño plaquetario de los controles. La relación entre variables independientes se calcula por el coeficiente de Pearson (r) utilizando el programa DeltaGraph Professional versión 2.0.

controla de manera importante la expresión plaquetaria de GPIIb/IIIa en condiciones fisiológicas.

4.5.2. Expresión del receptor GPIIb/IIIa en la diferenciación megacariocítica de las células MEG-01

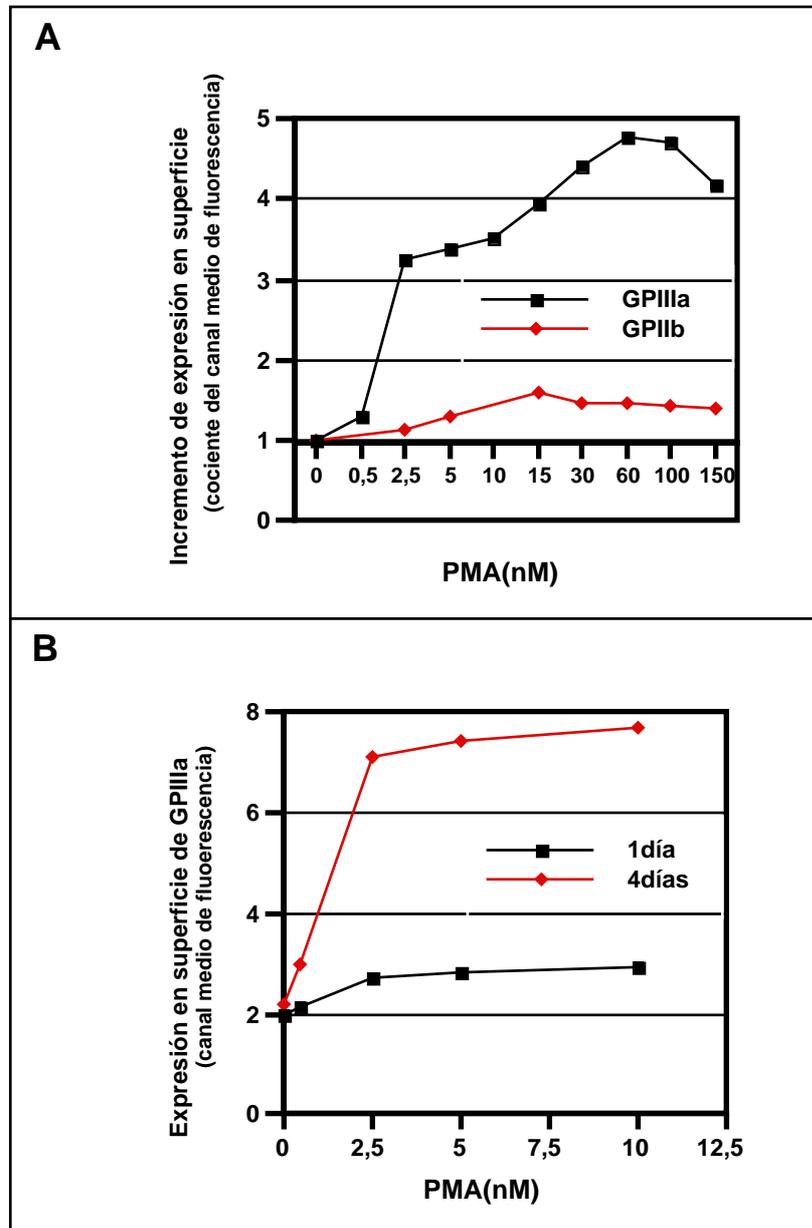
La diferenciación megacariocítica puede ser inducida por ésteres de forbol (PMA), agentes promotores de tumores. La diferenciación megacarioblástica de la línea celular MEG-01 conlleva un aumento de expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa, un aumento en la capacidad de adherencia e inhibición de la proliferación celular (Ogura *et al*, 1988). El aumento de expresión de GPIIb/IIIa inducido por PMA es dosis-dependiente, por ello, comenzamos estudiando qué concentraciones de PMA y durante qué período de tiempo se han de tratar las células para conseguir una diferenciación significativa sin que se vea demasiado afectada la viabilidad celular.

Células MEG-01, creciendo exponencialmente a una concentración de 2×10^5 /ml en medio RPMI-1640 con un 10% de suero, fueron incubadas con concentraciones entre 0,5 y 150 nM de PMA durante 4 días. Pasado este tiempo, se recogieron las células en suspensión y las adheridas al plato se despegaron mediante tratamiento con 0,5 mM EDTA. Se observó que el PMA provocaba una disminución del crecimiento celular y un aumento de la capacidad de adherencia. En las células recogidas al cuarto día se determinó el grado de diferenciación midiendo por citometría de flujo la expresión de GPIIb y GPIIIa. Las células MEG-01 sin tratar con PMA expresan cantidades detectables de complejo GPIIb/IIIa pero, como indica la figura 47 A, el tratamiento con concentraciones crecientes de PMA aumentó la expresión de GPIIb/IIIa, alcanzando un valor máximo con una concentración de 60 nM. Para determinar la viabilidad celular tras el tratamiento con PMA, las células fueron tratadas con yoduro de propidio (50 μ g/ml) y analizadas por citometría de flujo. Concentraciones de PMA por encima de 30 nM, redujeron la viabilidad celular por debajo del 50% a juzgar por el número de células que captaron el yoduro de propidio.

Para determinar el efecto del tiempo de exposición a PMA sobre la diferenciación, las células se trataron con 0,5, 2,5, 5 y 10 nM PMA y se analizaron al cabo de 1 o 4 días de tratamiento. En las células tratadas durante 1 día se observó una diferenciación menor que en las expuestas 4 días a la misma concentración de PMA (Figura 47 B). Estos datos parecen indicar que la diferenciación megacariocítica

Figura 47

DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA DE CÉLULAS MEG-01 INDUCIDA POR PMA



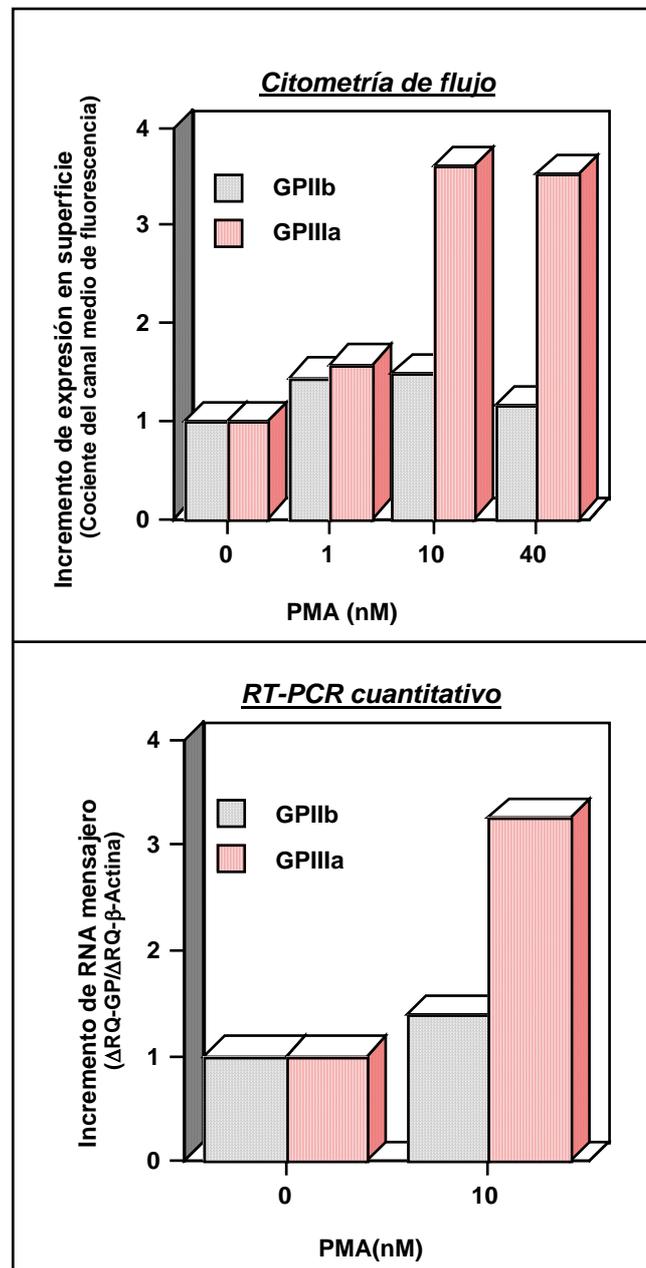
(A) Células MEG-01 son tratadas con concentraciones entre 0.5 y 150 nM de PMA durante 4 días. La expresión en superficie de GPIIb y GPIIIa se mide por citometría de flujo con anticuerpos específicos, como se describe en la sección de Métodos. Los resultados se representan como el cociente del canal medio de fluorescencia (unidad arbitraria a escala lineal) de células tratadas entre el de células sin tratar, en función de la dosis de PMA administrada en cada caso. (B) Células MEG-01 tratadas con 0.5, 2.5, 5 y 10nM de PMA se analizan al cabo de 1 o 4 días de tratamiento. El grado de diferenciación fue valorado determinando la expresión en superficie del complejo GPIIb/IIIa mediante citometría de flujo. En esta gráfica se recogen los valores de fluorescencia obtenidos con anti-GPIIIa al cabo de 1 o 4 días para cada uno de los tratamientos con PMA.

(expresión de GPIIb/IIIa) requiere un tiempo superior a 24 horas para que sea apreciable por los métodos analíticos utilizados.

En base a los datos expuestos, optamos por tratar las células con 1, 10 y 40 nM PMA durante 4 horas, o 1 hora en el último caso, e incubarlas durante tres días sin PMA antes de analizar por citometría de flujo el contenido de GPIIb/IIIa. La viabilidad con 1 y 10 nM de PMA no se vio afectada y con 10 nM PMA el aumento de expresión de GPIIb y GPIIIa fue suficientemente significativo como para poder estudiar qué tipo de correlación existe entre la expresión superficial de GPIIb y/o GPIIIa y los niveles de RNA mensajero. Para ello, se extrajo RNA total de células MEG-01 sin tratar o tratadas con 10 nM PMA. Se cuantificó el RNAm de GPIIb y GPIIIa por RT-PCR con sondas TaqMan específicas, normalizándose los resultados con los valores obtenidos para β -Actina. Calculando los cocientes de los valores obtenidos para células tratadas con PMA frente a células control, se observa que existe una correlación entre el incremento de GPIIb y GPIIIa en superficie, medido por citometría de flujo, y el incremento de RNAm, medido por RT-PCR cuantitativo (Figura 48). El incremento de RNAm de GPIIb y su expresión en superficie al tratar las células MEG-01 con 10 nM de PMA es sólo de 0,5 veces, mientras que el incremento observado para GPIIIa en ambos casos es mucho mayor, aproximadamente 2-2,5 veces. Para confirmar los datos anteriores, analizamos mediante transferencia de western los lisados de células MEG-01 tratadas o no con 10 nM PMA (resultados no mostrados). Los resultados confirmaron que la inducción con PMA incrementa de forma más notable los niveles de GPIIIa que los de GPIIb.

Figura 48

RELACIÓN ENTRE NIVELES DE RNAm Y EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE GPIIb Y GPIIIa EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MEG-01 INDUCIDA POR PMA



Células MEG-01 tratadas con 1nM, 10nM o 40 nM de PMA durante 4 horas o 1 hora en el último caso, se incuban durante tres días sin PMA antes de analizar el contenido de GPIIb y GPIIIa mediante citometría de flujo (Panel superior) con anticuerpos anti-GPIIb y anti-GPIIIa. Al mismo tiempo, se extrajo RNA total de células MEG-01 sin tratar o tratadas con 10 nM PMA. Se cuantificó el RNAm de GPIIb y GPIIIa por RT-PCR con sondas TaqMan específicas, normalizándose los resultados con los valores de β -Actina (Panel inferior). Los resultados muestran los cocientes de los valores obtenidos en células tratadas con PMA entre los de células control sin tratar.

5- DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. DETECCIÓN DE MUTACIONES INÉDITAS EN EL GEN DE GPIIb ASOCIADAS A TROMBOASTENIA DE GLANZMANN

Como resultado del estudio de enfermos diagnosticados clínicamente de tromboastenia de Glanzmann, hemos detectado cuatro nuevas mutaciones en la glucoproteína GPIIb (Tabla IX). Hasta el momento, las mutaciones detectadas en casos de TG se reparten prácticamente por igual en ambas subunidades (French, 1998), por lo que la razón de que sólo hayamos encontrado mutaciones en GPIIb probablemente no sea significativo. De acuerdo con comunicaciones previas, llama la atención la heterogeneidad del tipo y localización de las lesiones halladas: deleciones con desplazamiento del marco de lectura y mutaciones puntuales que dan lugar a la sustitución de un residuo o a la aparición de un codón de terminación prematuro. La veracidad de las mutaciones encontradas fue corroborada por distintos procedimientos analíticos utilizando DNA de distintas amplificaciones y estudiando también a los progenitores y otros miembros de la familia de los pacientes. Los siguientes criterios indicaron que las mutaciones halladas estaban relacionadas con el fenotipo tromboasténico: 1) ausencia de la mutación en más de 100 DNAs genómicos de individuos sanos y sin antecedentes familiares de hemopatías; 2) disminución del contenido plaquetario de GPIIb/IIIa en familiares heterocigotos, demostrable por varios criterios analíticos; 3) demostración de alteración funcional de las subunidades mutadas mediante experimentos de expresión heteróloga en células eucariotas.

En uno de los casos estudiados, las plaquetas del paciente no se agregaban espontáneamente o en respuesta a agonistas. La estructura de los genes de GPIIb y GPIIIa resultó ser normal y el análisis de citometría reveló la presencia de cantidades normales de GPIIb/IIIa en las plaquetas del paciente. Este caso de “variante” de tromboastenia es de gran interés porque refleja, con toda probabilidad, que la falta de agregación plaquetaria de este paciente es el resultado de una alteración en algún mecanismo de señalización intracelular que permite que distintos agonistas o estímulos den lugar a cambios de afinidad en el receptor de fibrinógeno por su ligando. Sin embargo, el propio receptor GPIIb/IIIa no es responsable de la patología del enfermo.

Tabla IX

Detección de lesiones genético-moleculares en GPIIb asociadas a fenotipos tromboasténicos

Tipo	Mutación	Gen/Exón/Base/Codón	AA sustituido
I	C-Delección*	IIb / 2 / 288-291 / 96-97	Cambio de fase
I	CGA→TGA	IIb / 19 / 1882 / 597	Arg ⁵⁹⁷ →Stop
I	GAA→AAA	IIb / 12 / 1063 / 324	Glu ³²⁴ →Lys
II	TGT→CGT	IIb / 21 / 2113 / 674	Cys ⁶⁷⁴ →Arg
Variante	Ninguna	----	----

* Esta mutación fue hallada en dos familias distintas en las que se han detectado posibles ancestros comunes.

5.2. BASES MOLECULARES DEL FENOTIPO TROMBOASTÉNICO Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

Como paso previo a cualquier tipo de estudio funcional hemos realizado una determinación cuantitativa de los niveles de RNA mensajero de GPIIb y GPIIIa en las plaquetas de los pacientes. Este proceder encuentra justificación en el hecho de que las mutaciones que generan un codón de terminación prematuro, con gran frecuencia, dan lugar a un procesamiento alternativo del RNAm y/o alteran la estabilidad de los transcritos (Dietz *et al*, 1993). La Tabla X muestra cómo las lesiones que generan un codón de terminación, cursan con una cantidad reducida de RNAm, mientras que las otras dos mutaciones presentaron niveles normales. En los casos de disminución o ausencia de RNAm de la subunidad mutada, es evidente que la falta de proteína es la etapa limitante para la expresión en superficie de GPIIb/IIIa por lo que no sería

necesario realizar ningún tipo de estudio funcional. Respecto a los codones prematuros de terminación, en la actualidad es imposible predecir si alterarían la cantidad del mensajero que los contiene. Se han descrito mutaciones en GPIIb que generan codones de terminación prematuros que no alteran la cantidad de mensajero (Vinciguerra *et al*, 1996; Iwamoto *et al*, 1994) o que lo disminuyen de forma acusada (Tomiyama *et al*, 1995). Estas diferencias parecen deberse a que el efecto de la aparición de un codón de terminación depende de su posición, ya que cuanto más próximo esté al extremo 5' de la secuencia codificadora más inestable será el RNA mensajero (Cooper, 1993).

Tabla X

Contenido plaquetario de RNAm de GPIIb en los casos de tromboastenia estudiados

Disminución o ausencia de RNAm de GPIIb

Mutaciones que provocan la aparición de un codón stop

IIb/exón 2	288delC	desplazamiento marco de lectura-Stop
IIb/exón 19	C ¹⁸⁸² →T	Arg ⁵⁹⁷ →Stop

Cantidad normal de mRNA

Mutaciones puntuales que dan lugar a la sustitución de un solo residuo

IIb/exón 21	T ²¹¹³ →C	Cys ⁶⁷⁴ →Arg
IIb/exón 12	G ¹⁰⁶³ →A	Glu ³²⁴ →Lys

Los casos con cantidades normales de mensajero fueron sometidos a estudios funcionales mediante transfección de los cDNAs que codifican las subunidades

normal y mutada en células de ovario de hámster chino (CHO). En este tipo de estudio, hemos valorado la capacidad de las subunidades mutadas para formar heterodímeros y la capacidad de los complejos GPIIb/IIIa recombinantes, normales o mutados, para expresarse en la superficie de las células transfectadas. La expresión superficial de GPIIb/IIIa fue analizada mediante citometría de flujo y/o marcaje de células intactas con biotina seguido de inmunoprecipitación de GPIIb y/o GPIIIa con monoclonales específicos. La síntesis y/o acúmulo intracelular de subunidades se detectó mediante marcaje de los lisados celulares totales. La Tabla XI resume algunos de los hallazgos más importantes de este tipo de estudios.

Tabla XI

Bases moleculares del fenotipo tromboasténico

Mutación	Tipo de TG	Mecanismo
GPIIb [delC288]	I	Ausencia de RNAm-GPIIb
GPIIb / Arg ⁵⁹⁷ →Stop	I	Ausencia de RNAm-GPIIb
GPIIb / Glu ³²⁴ →Lys	I	Ausencia de heterodimerización
GPIIb / Cys ⁶⁷⁴ →Arg	II	Alteración del plegamiento, procesamiento y tráfico intracelular
Ninguna	Variante	Alteración de señalización? *

* La ausencia de mutaciones en GPIIb/IIIa junto con la falta de agregación en respuesta a agonistas, hace suponer que existe una perturbación en el mecanismo señalización intracelular común a los receptores de los agonistas que intervienen en el proceso de activación plaquetaria.

5.2.1. Clasificación por subtipos de la tromboastenia de Glanzmann

En un principio, Zucker y colaboradores demostraron que las plaquetas de los pacientes tromboasténicos no se adherían ni extendían normalmente sobre un cristal y su contenido de fibrinógeno plaquetario era de aproximadamente un 10-25% del valor normal (Zucker 1964; Zucker *et al*, 1966). Este hecho condujo a la identificación de fallos en la fijación de fibrinógeno y, finalmente, al complejo GPIIb/IIIa como responsable de la patología tromboasténica (Nurden y Caen, 1974); razón por la cual, la forma más común de clasificación de las tromboastenias es la basada en el contenido plaquetario de GPIIb/IIIa (George *et al*, 1990). En las tromboastenias de tipo I existe una ausencia total de receptor; las de tipo II muestran niveles de receptor inferiores al 20% y, finalmente, las llamadas "variantes" tienen cantidades normales de complejo GPIIb/IIIa pero incapaz de fijar fibrinógeno de forma eficiente. Actualmente, los estudios genéticos y bioquímicos han permitido clasificar esta patología de acuerdo a otros criterios que permiten un conocimiento más preciso de la etiopatogenia de esta enfermedad. La Tabla XII recoge las distintas posibilidades de subclasificación de las tromboastenias. Nosotros hemos tratado de identificar las bases moleculares de los casos de fenotipo tromboasténico objeto de este estudio y encuadrarlos dentro de uno de los subtipos descritos. Nuestro estudio es el primero en que se ha determinado de modo cuantitativo el contenido plaquetario de mensajeros de GPIIb y/o GPIIIa. De igual forma, como discutiremos más adelante, hemos determinado que la interacción de subunidades mutadas con proteínas chaperonas del retículo endoplasmático son la causa de la disminución de la velocidad de tránsito de complejos GPIIb/IIIa hasta la membrana plasmática y pueden provocar un efecto negativo en condiciones de heterocigosis. Parece importante considerar este último aspecto como otro criterio de subclasificación en el estudio de las tromboastenias

Tabla XII

Criterios de subclasificación de la tromboastenia de Glanzmann

- I. DEFECTOS DE DNA
 - A. Tipo de lesión
 - B. Topografía de la lesión
 - C. Efecto de la lesión
 - II. SUBUNIDAD AFECTADA
 - III. RECEPTOR(ES) AFECTADOS
 - A. GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)
 - B. $\alpha_v\beta_3$
 - IV. DEFECTO BIOSINTETICO
 - A. Estabilidad y niveles de RNA mensajero
 - B. Síntesis, plegamiento o estabilidad de polipéptidos
 - C. Formación de complejos
 - D. Estabilidad de complejos
 - E. Maduración de complejos
 - F. Tráfico intracelular de complejos
 - V. ALTERACIÓN FUNCIONAL DE GPIIb/IIIa
 - A. Cuantitativa
 - B. Cualitativa
 - 1. Complejos inestables
 - 2. Mutaciones que perturban la fijación del ligando
 - 3. Mutaciones puntuales que afectan a la activación de GPIIb/IIIa por agonistas
-

5.3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES ASOCIADAS CON FENOTIPO TROMBOASTÉNICO

5.3.1. Significado funcional de la mutación Cys⁶⁷⁴→Arg de GPIIb asociada a tromboastenia tipo II

La transición T²¹¹³→C del exón 21 de GPIIb provoca la sustitución del residuo 674C por arginina (674R) causando la ruptura del puente disulfuro intracatenario 674-687 de GPIIb. Esta mutación se encontró en un paciente tromboasténico heterocigoto, cuyo contenido plaquetario de GPIIb/IIIa es sólo el 10% del control normal y únicamente posee el RNAm-GPIIb que codifica la forma mutada [674R]GPIIb. La cotransfección transitoria de GPIIIa junto con la forma normal o mutante de GPIIb en células de CHO nos ha permitido demostrar que este residuo es esencial para el correcto procesamiento del complejo GPIIb/IIIa. Tanto el análisis en plaquetas como en células transfectadas, parecen coincidir en que la ruptura del puente disulfuro intracatenario 674-687 de GPIIb impide una conformación apropiada de esta subunidad, interfiriendo en algún paso del proceso de maduración y/o expresión en membrana del complejo maduro GPIIb/IIIa. Por tanto, la mutación Cys⁶⁷⁴→Arg de GPIIb provoca un defecto cuantitativo del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$; sin embargo, la conservación del puente disulfuro 674-687 no parece ser esencial desde un punto de vista cualitativo o funcional. Según nuestras observaciones, las plaquetas de la paciente y de su madre, portadoras de esta mutación, respondieron a diversos activadores fijando fibrinógeno soluble de manera proporcional al número de receptores que poseen en la superficie plaquetaria. Por tanto, esta mutación parece no afectar a los procesos de activación del receptor ni al reconocimiento de sus ligandos.

5.3.1.1. Importancia de los puentes disulfuro en la formación y expresión superficial de complejos GPIIb/IIIa

Los puentes disulfuro son importantes para la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas y su ensamblaje en complejos multiméricos (Seckler y Jaenicke, 1992). La ruptura de distintos puentes disulfuro de GPIIb y GPIIIa puede tener consecuencias variables. La delección de los residuos 106A-111Q de GPIIb que incluye a la cisteína 107, elimina el puente intracatenario 107-130 de GPIIb impidiendo la heterodimerización de los complejos (Newman *et al*, 1991). Resultados similares se observan en la delección 129S-161S que comprende los residuos 130C y 146C de GPIIb. En la subunidad GPIIIa, algunas mutaciones que afectan a residuos de

cisteínas como C374Y y C560F están asociadas a tromboastenias tipo II (Grimaldi *et al*, 1996; Ambo *et al*, 1998) mientras que las sustituciones C542R y C457Y están involucradas en TG tipo I (Ruan *et al*, 1999; Milet *et al*, 1997). Sin embargo, la eliminación de la cisteína 655 de GPIIIa no afecta a la formación de los complejos GPIIb/IIIa (Wang *et al*, 1997). Las cisteínas 674 y 687 de GPIIb están conservadas en todas las subunidades α de las integrinas que reconocen ligandos RGD ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$) y que sufren un procesamiento endoproteolítico en su síntesis. En las subunidades α_7 y α_8 que no reconocen ligandos RGD, pero sí sufren proteólisis, estas dos cisteínas también están conservadas. Estas observaciones sugieren que el puente disulfuro 674-687 de GPIIb debe jugar un papel importante para el plegamiento correcto de esta proteína.

Los experimentos de mutagénesis de los residuos 674 y 687 de GPIIb indicaron que la ruptura del puente disulfuro por la sustitución de la cisteína 687 por alanina produce los mismos efectos negativos sobre la expresión de complejos GPIIb/IIIa. La sustitución de 674C por alanina, en vez de arginina, mejora la expresión en superficie, lo cual sugiere que la presencia de un residuo cargado positivamente en esta posición provoca un cambio conformacional aún menos eficiente. Aunque las mutaciones de los residuos 674C y 687C tienen efectos similares, la mutación conjunta de ambas cisteínas tiene un efecto aditivo. Esta observación sugiere que la sustitución de ambas cisteínas produce efectos negativos adicionales a los producidos por la pérdida del puente disulfuro, presumiblemente debidos a cambios conformacionales menos favorables. Es probable que cuando sólo está mutada una de las cisteínas, la otra forme enlaces alternativos con otras cisteínas, dando lugar a una conformación que mejore el tráfico intracelular de GPIIb/IIIa.

5.3.2. Mutación [288delC] en el exón 2 de GPIIb

Hemos estudiado las bases genético moleculares del fenotipo tromboasténico de dos casos que presentaban hemorragias mucocutáneas, aumento del tiempo de sangrado y ausencia de agregación plaquetaria espontánea o en respuesta a agonistas. La ausencia de complejo GPIIb/IIIa plaquetario confirmó el diagnóstico clínico de tromboastenia de Glanzmann (TG) tipo I. El análisis de polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (SSCP) y la secuenciación del exón 2 y de las zonas intrónicas

adyacentes de GPIIb, desveló la existencia de una delección homocigota de la citosina de la posición 288 relativa al sitio de inicio de traducción. Esta delección desplaza el marco de lectura dando lugar a la aparición de un codón prematuro de terminación. La traducción de este mensajero daría lugar a una proteína truncada de tan solo 109 residuos. Los familiares heterocigotos para esta mutación muestran también una reducción del contenido plaquetario de GPIIb/IIIa. En este caso, es evidente que la ausencia de $\alpha_{IIb}\beta_3$ en las plaquetas de los pacientes es debida a la falta de RNAm de GPIIb y, por tanto, se puede concluir que ésta es la causa del fenotipo tromboasténico de estos pacientes. Se han descrito otros casos en los que la aparición prematura de codones sin sentido en ciertas posiciones provoca una reducción del RNAm, probablemente como mecanismo para evitar la síntesis de proteínas truncadas o no funcionales que puedan incidir negativamente en los procesos normales.

Como cabría esperar, la cotransfección de células CHO con cDNAs de GPIIIa y [288delC]GPIIb no incrementó la exposición superficial de GPIIIa, ni se detectaron complejos [288delC]GPIIb/IIIa. Cuando se cotransfectaron GPIIIa y la forma mutada de GPIIb con una delección interna del exón 3, no se pudo detectar la presencia de heterodímeros. Esta observación indica, por primera vez, que la integridad del exón 3 de GPIIb es esencial para que se produzca la heterodimerización de las subunidades GPIIb y GPIIIa.

5.3.3. Mutación Arg⁵⁹⁷ → STOP en el exón 19 de GPIIb

El análisis de restricción del exón 19 de GPIIb en un número significativo de individuos normales no reveló la presencia de la mutación Arg⁵⁹⁷→Stop. Tanto en el análisis citofluorimétrico como en la inmunoprecipitación de lisados de plaquetas del paciente con distintos anticuerpos, no se pudo detectar la presencia de GPIIb y se observó una reducción importante en los niveles de GPIIIa. En los padres heterocigotos había una disminución significativa de ambas subunidades. El estudio de los niveles de RNAm de GPIIb del paciente y de los individuos heterocigotos de la familia reflejó que la aparición de un codón de terminación prematuro en esta posición provoca una disminución en los niveles de RNAm, posiblemente al generar una forma de mensajero muy inestable que será rápidamente degradado. Al igual que en el caso anterior, la reducida expresión del receptor plaquetario GPIIb/IIIa es debida

a la disminución de RNAm-GPIIb. Los experimentos de transfección demostraron la incapacidad de la forma mutada de GPIIb para formar complejos con GPIIIa. Por tanto, en el supuesto de que el RNAm no fuera limitante la mutación Arg⁵⁹⁷→Stop seguiría dando lugar a un fenotipo tromboasténico. Alteraciones en los niveles de un RNA mensajero pueden deberse a mutaciones de las regiones promotoras o a mutaciones que afectan la estabilidad o vida media de los transcritos. En la tromboastenia de Glanzmann, las mutaciones que afectan a los niveles de RNAm y que han sido identificadas hasta el momento únicamente pertenecen a la segunda opción. Entre estas mutaciones se han encontrado deleciones, inserciones, inversiones, mutaciones que cambian los sitios de “splicing” y mutaciones puntuales que provocan la aparición de un codón prematuro de terminación. Hasta ahora, no se conoce el mecanismo real por el cual la presencia de un codón de terminación prematuro induce la inestabilidad del mensajero. Una de las explicaciones propuestas para este fenómeno es que la finalización prematura de la traducción de proteínas provoca la pérdida de la protección del RNAm por los ribosomas, haciendo que sea más susceptible a la digestión por RNAsas endógenas (Hagan *et al*, 1995). También se han propuesto mecanismos de conexión entre la existencia de proteínas truncadas y procesos intranucleares por los cuales el transporte desde el núcleo de un RNA mensajero específico puede ser inhibido (Baserga y Benz, 1988). La transición C→T en el último codón del exón 17 de GPIIb, que provoca la sustitución de R553 por una señal de terminación, se ha encontrado en seis familias distintas y en todos los casos, los pacientes presentaban niveles reducidos de RNA mensajero (Kato *et al*, 1992; Gu *et al*, 1993; Vinciguerra *et al*, 1995; Tomiyama *et al*, 1995). Otra interesante mutación que también produce la disminución de los niveles de RNA es una inserción de dos pares de bases en el exón 30 de GPIIb. Esta mutación provoca un desplazamiento del marco de lectura que genera la desaparición del codón de terminación al final del dominio citoplasmático de GPIIb (French *et al*, 1997). En el caso de GPIIIa, se han descrito mutaciones en sitios de splicing, deleciones e inversiones que provocan una terminación prematura y afectan también a los niveles de sus transcritos (Bray y Shuman, 1990; Li y Bray, 1993; Djaffar *et al*, 1993).

5.3.4. La mutación Glu³²⁴ → Lys de GPIIb impide su asociación con GPIIIa

La ausencia de glucoproteína plaquetaria GPIIb analizada mediante citometría de flujo y análisis de western confirmaron el diagnóstico clínico de tromboastenia de este paciente,

demostrando que se trataba de un caso de TG tipo I. El estudio de los genes de GPIIb y GPIIIa permitió desvelar la existencia de la transición homocigota G1063A en GPIIb, siendo ésta la única mutación encontrada. El significado patológico de esta mutación también se demuestra por el reducido contenido plaquetario de GPIIb/IIIa en los miembros heterocigotos de la familia. Esta misma mutación se ha asociado a otros tres casos de fenotipos tromboasténicos (Ambo *et al*, 1998; Ruan *et al*, 1998; Milet *et al*, 1999). El hecho de que distintas familias no relacionadas y de distintas etnias posean la misma mutación puede indicar que este sitio sea particularmente susceptible a ser mutado.

La cuantificación del RNAm de GPIIb demostró que el gen de [324K]GPIIb se transcribe normalmente, por lo que, en este caso, la disponibilidad de mensajero no puede ser la causa de la falta de expresión de GPIIb/IIIa en el paciente o de la reducida expresión en los individuos heterocigotos. Esta última observación sugirió que debía ser la maduración y/o el tráfico intracelular de [324K]GPIIb, alguno de los mecanismos que están impedidos. En experimentos de transfección de células CHO con esta forma mutada, la incapacidad de los anticuerpos anti-GPIIb y anti-GPIIIa para coprecipitar formas maduras de GPIIb indican que [324K]GPIIb no llega a formar heterodímeros con GPIIIa. Los análisis de pulso y caza mostraron un flujo normal de precursores radiactivos a través de proGPIIb y GPIIIa pero una completa ausencia de GPIIb madura. Por ello, parece razonable concluir que el mecanismo molecular que da lugar al fenotipo tromboasténico es la incapacidad de [324K]GPIIb de dimerizar con la subunidad GPIIIa. Hemos podido observar que pro[324K]GPIIb está asociada fuertemente a la chaperona BiP; sin embargo, el significado patológico de esta observación no está claro pues la asociación de BiP con otras formas mutantes de GPIIb no impide por completo su expresión en la superficie celular.

La sustitución E324K es un caso similar al de otras mutaciones descritas (G273D, Poncz *et al*, 1994; F289S, Ambo *et al*, 1998; R327H, Ferrer *et al*, 1996; G418D, Wilcox *et al*, 1994) por su localización en la región de GPIIb que comprende los dominios de unión de calcio. Debido a la localización peculiar de estas mutaciones, se puede suponer que su mecanismo patológico está relacionado con cambios en su capacidad para fijar calcio y, por tanto, mantener la asociación de las subunidades. Alternativamente, la sustitución de ciertos residuos puede impedir la apropiada conformación de la proteína para su asociación con GPIIIa. El alto grado de conservación de la región 321-328 de las subunidades α de muchas integrinas sugiere que puede ser un dominio funcional involucrado en la dimerización de

las subunidades. En la familia de las integrinas β_2 , el residuo homólogo al 324E de GPIIb es una arginina. Los estudios de mutagénesis de este residuo demostraron que su sustitución por aminoácidos cargados negativamente, polares o hidrofóbicos, permiten la expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa, mientras que cualquier residuo con carga negativa produce el efecto contrario, impidiendo la dimerización de proGPIIb con GPIIIa. Finalmente, se puede concluir que la zona altamente conservada de GPIIb 324E-328V debe contener un dominio determinante para la dimerización y/o normal procesamiento de los complejos GPIIb/IIIa.

5.4. IMPORTANCIA DE LA REGIÓN CARBOXI-TERMINAL DE GPIIIa EN LA EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DE LA AFINIDAD DEL RECEPTOR DE FIBRINÓGENO

Una importante herramienta de trabajo para el estudio de la correlación estructura-función de los distintos dominios de GPIIb/IIIa es el análisis del efecto de las mutaciones detectadas en pacientes tromboasténicos o bien de las introducidas en sitios deseados mediante mutagénesis. Para examinar el papel de las distintas regiones del extremo carboxilo (616-762) de GPIIIa en la expresión y modulación de la afinidad de GPIIb/IIIa, transfectamos células CHO con una serie de GPIIIa mutantes junto a GPIIb. De este modo, observamos que las construcciones de GPIIIa que carecen de los dominios de transmembrana y citosólicos poseen una baja eficacia en la formación de heterodímeros con GPIIb y por ello, su expresión en superficie está gravemente afectada. La presencia de estos dominios es necesaria para una correcta expresión del receptor. La tromboastenia de Glanzmann de judíos iraquíes está asociada a una deleción de 11 pb en el exón 12 de GPIIIa que da lugar a una proteína truncada antes del dominio transmembranar (GPIIIa Δ 650-762) (Newman *et al*, 1991). En estos pacientes, acorde con nuestros resultados, se ha demostrado la presencia de proGPIIb y ausencia de receptores de fibrinógeno y vitronectina (Coller *et al*, 1987; Coller *et al*, 1991).

La deleción interna de los residuos 616-690 del dominio extracelular de GPIIIa no altera el procesamiento ni la expresión en superficie del receptor GPIIb/IIIa, pero provoca cambios de afinidad por el fibrinógeno, dando lugar a receptores

constitutivamente activos. La agregación plaquetaria y la unión del fibrinógeno soluble a GPIIb/IIIa requiere la activación del receptor mediante una señalización intra o extracelular, pero todavía no se conocen en profundidad los mecanismos que regulan este proceso. La ausencia de la región 616-690 implica la pérdida de varios residuos de cisteína y la ruptura del puente disulfuro C406-C655, que podrían provocar un plegamiento anormal de la proteína sin afectar a la expresión del receptor; de hecho, se ha descrito que la pérdida de este puente disulfuro de GPIIIa no impide la expresión en superficie de heterodímeros GPIIb/IIIa funcionales (Wang *et al*, 1997).

La importancia de esta zona deletada de GPIIIa en la modulación de la afinidad del receptor, podría estar relacionada con su contenido en cisteínas. Otras mutaciones descritas en la subunidad GPIIIa que dan lugar a complejos constitutivamente activos afectan a cisteínas involucradas en puentes disulfuro (Liu *et al*, 1998) y a residuos comprendidos en la región 423-622 de las repeticiones ricas en cisteína (Ambo *et al*, 1998; Kashiwagi *et al*, 1999). Además, se ha demostrado recientemente la existencia de una actividad tiol-isomerasa en la subunidad GPIIIa que reside en estas repeticiones ricas en cisteína (O'Neill *et al*, 2000). Esta actividad enzimática endógena sugiere que los puentes disulfuro de la propia integrina o de sus substratos podrían modificarse localmente durante la activación del complejo GPIIb/IIIa. De hecho, se ha observado un aumento de grupos tiol libres en la superficie de las plaquetas tras su activación (Burgess *et al*, 2000). Será necesario continuar este estudio para llegar a determinar con mayor precisión la importancia de esta región extracelular adyacente a la membrana de la subunidad GPIIIa en la activación del receptor de fibrinógeno.

5.5. ETAPAS LIMITANTES PARA LA EXPRESIÓN SUPERFICIAL DE GPIIb/IIIa

5.5.1. Contenido plaquetario de GPIIb/IIIa en portadores de mutaciones heterocigotas

La tromboastenia de Glanzmann se ha descrito como una enfermedad autosómica recesiva. El carácter recesivo de esta patología puede ser la causa del poco interés que ha despertado el estudio de los familiares heterocigotos. La mayoría de estos individuos poseen alrededor de un 50% de receptor plaquetario de fibrinógeno pero son asintomáticos. Por tanto, la mitad de los niveles normales de GPIIb/IIIa parece ser suficiente para no mostrar anomalías hemostáticas graves. El hecho de que los familiares heterocigotos de mutaciones asociadas a fenotipos tromboasténicos expresen cantidades anormales de GPIIb/IIIa, podría interpretarse, en principio, en el sentido de que la disponibilidad de mensajero es la etapa limitante para la expresión de estos complejos. Si así fuese, la presencia de un sólo alelo funcionante debería dar lugar a un contenido plaquetario de GPIIb/IIIa de alrededor del 50% del control; sin embargo, ese no es el caso de algunas mutaciones, como la que genera la proteína truncada GPIIIa[Δ616] que no da lugar a cambios significativos en la tasa de expresión plaquetaria de GPIIb/IIIa en individuos heterocigotos (Ferrer *et al*, 1998). Por otro lado, mutaciones como C674R dan lugar a una expresión plaquetaria por debajo del 50% en los casos de heterocigosis. Estas observaciones indican que, además de la disponibilidad de mensajero, otros factores deben determinar la expresión superficial de GPIIb/IIIa. Uno de estos factores podría ser, de acuerdo con observaciones previas de nuestro laboratorio, que la expresión de una forma mutada de GPIIb (o de GPIIIa) pudiera interferir con la expresión de la proteína normal. En base a estos antecedentes, hemos estudiado con mayor detalle ambas posibilidades, cuyos resultados discutimos a continuación.

5.5.2. Correlación entre niveles de RNAm y expresión superficial de GPIIb/IIIa

La expresión en superficie de complejos GPIIb/IIIa es un proceso en el que intervienen múltiples etapas. Nosotros hemos estudiado la correlación entre el contenido plaquetario de RNAm de GPIIb y GPIIIa y la tasa de expresión en superficie del receptor GPIIb/IIIa. También hemos determinado en pacientes tromboasténicos, si la tasa de RNAm de GPIIb y GPIIIa estaba o no alterada, y en qué grado. Para ello hemos puesto a punto una técnica que nos ha permitido medir el contenido de mensajeros en plaquetas y en líneas celulares megacariocíticas con distintos grados de diferenciación. El sistema TaqMan que hemos utilizado permite la determinación cuantitativa de la muestra amplificada por PCR. La única diferencia entre este sistema y los procedimientos rutinarios de PCR es la adición de una sonda

fluorogénica diseñada para hibridar con una secuencia concreta. Este sistema sirve para una evaluación cuantitativa que garantiza la especificidad del producto de PCR que se está midiendo. Además, la intensidad de la señal fluorescente permite la detección de productos de PCR en muestras que originalmente contienen poca cantidad de RNAm, incluso después de un número limitado de ciclos. Esto es importante para los casos en que la disponibilidad de muestra es limitada. Otra ventaja de este sistema es la facilidad y rapidez del análisis de la muestra, ya que no requiere ninguna manipulación posterior al PCR como electroforesis o marcajes que pueden introducir fuentes de error.

Para estudiar la correlación RNAm-proteína comenzamos por estudiar el grado de variabilidad que existe en una población de individuos sanos sin antecedentes familiares de hemopatías. Los resultados indicaron que con las técnicas empleadas, las cantidades de GPIIb y GPIIIa en la superficie plaquetaria varían en unos rangos lo suficientemente amplios como para ver diferencias entre individuos sanos. La correlación entre los contenidos de mensajero y de proteína en membrana parece más estrecha en el caso de GPIIb que en el de GPIIIa. Todo ello parece indicar que las variaciones en la expresión superficial del complejo GPIIb/IIIa vienen determinadas por los niveles de RNAs mensajeros, siendo la tasa de transcripción de los genes de estas glucoproteínas y de una manera más acusada la de GPIIb, la que regula de manera importante los niveles finales de GPIIb/IIIa en las plaquetas de cada individuo. La subunidad α_{IIb} se expresa casi exclusivamente en plaquetas y en líneas megacarioblásticas, mientras que la subunidad β_3 se sintetiza y se expresa formando complejos con α_v en una gran variedad de líneas celulares, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que la regulación de la síntesis de α_{IIb} fuera más importante en la expresión del receptor GPIIb/IIIa. Nosotros también hemos demostrado cómo el aumento de expresión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ que provoca el PMA en las células megacarioblásticas MEG-01 es paralelo a un incremento similar de los RNAs mensajeros de ambas subunidades. Las células MEG-01 pueden servirnos como el modelo más próximo a la realidad para estudiar los procesos que envuelven la síntesis y regulación de la expresión del receptor de fibrinógeno, ya que es una línea celular humana que posee los factores y las características necesarias para ello; no obstante, los resultados obtenidos se han de interpretar con reservas, pues estas células son de origen

leucémico y el PMA no es un estimulador fisiológico de la maduración megacariocítica.

Los pacientes y los familiares heterocigotos portadores de mutaciones que afectan a la estabilidad del RNAm de GPIIb, ponen de manifiesto la importancia de la disponibilidad de RNAm para la expresión final de estas glucoproteínas. En contraste con las mutaciones de GPIIb, pero de acuerdo a las observaciones vistas en la población control, Ferrer y colaboradores (1998) describieron a individuos heterocigotos, portadores de la mutación que genera la proteína truncada GPIIIa[Δ616], con un contenido plaquetario normal de GPIIb/IIIa. En estos individuos los transcritos de un solo alelo funcional permitían la síntesis suficiente de GPIIIa para mantener una tasa normal de expresión superficial de receptores plaquetarios. En base a estas observaciones, se puede concluir que es principalmente la disponibilidad de RNAm de GPIIb, no tanto la de mRNA-GPIIIa, una etapa limitante en la síntesis y tasa de expresión final de los receptores plaquetarios de fibrinógeno.

5.5.3. Efecto dominante negativo de mutaciones en GPIIb/IIIa

Individuos heterocigotos portadores de la mutación C674R de GPIIb muestran un contenido plaquetario de GPIIb/IIIa del ~30% de los controles normales, lo cual es menos que la cifra estimada del 50% para un alelo funcional normal. Esta reducción del contenido plaquetario de GPIIb/IIIa en condiciones de heterocigosis plantea la posible existencia de algún tipo de interacción negativa entre las subunidades normal y mutante de GPIIb. La confirmación de esta posibilidad se obtuvo a partir de los resultados que muestran cómo la coexpresión de GPIIb normal y [674R]GPIIb produce una inhibición dosis-dependiente de la expresión de complejos GPIIb/IIIa en células CHO-IIIa, sugiriendo que [674R]GPIIb interfiere en la asociación y/o tráfico intracelular de la subunidad normal. El efecto inhibitor de una proteína mutante sobre la expresión de la forma correcta es conocido como “efecto dominante negativo” (Hershkowitz, 1987). Hay descritos varios ejemplos de enfermedades humanas causadas por mutaciones dominantes negativas, como el mutante de la proteína p53 supresora de tumores (Unger *et al*, 1993), el receptor mutante de hormona tiroidea (c-erbAβ1) en el síndrome de resistencia a hormona tiroidea (Parrilla *et al*, 1991; Nagaya y Jameson, 1993) y mutaciones en el dominio tirosina-quinasa del receptor de insulina

(Frattali *et al*, 1992). En nuestro caso, el efecto dominante negativo podría estar relacionado con la interacción de la proteína mutada, cuyo plegamiento es anómalo, con chaperonas del retículo endoplásmico.

5.5.4. La interacción de la chaperona BiP con formas mutadas de GPIIb es responsable del efecto dominante negativo causado por [674R]GPIIb

La unión estable de BiP a [674R]GPIIb, además de disminuir la tasa de expresión de [674R]GPIIb/IIIa, perturba la expresión de las subunidades normales. Recientemente, se han estudiado otras mutaciones de proteínas de membrana que causan la retención de la proteína en el retículo y ejercen también un efecto dominante negativo sobre las formas normales (Dhermy *et al*, 1999; Masuda y Montero, 2000). Según estas observaciones, parece haber una estrecha correlación entre la unión estable de las chaperonas a proteínas con un plegamiento anormal y la inhibición que provocan cuando se coexpresan con la proteína nativa. En condiciones normales, la proteína chaperona BiP (GRP78) se encuentra en el lumen del retículo endoplasmático donde se une transitoriamente a los péptidos nacientes, permitiendo su correcto plegamiento y ensamblaje. Cuando una proteína muestra una secuencia anómala que da lugar a plegamientos alternativos, la unión de esta chaperona es más estable, provocando la retención del polipéptido en el retículo endoplasmático. En este sentido, estudiamos la interacción de [674R]GPIIb con la proteína chaperona BiP y su implicación en la baja tasa de expresión superficial de complejos [674R]GPIIb/IIIa. La proteína BiP se encontró asociada a todas las formas mutadas de los residuos 674 y 687 de GPIIb, las cuales presentaron una tasa de expresión siempre inferior al 50% de los valores normales. Según estas observaciones, parece lógico concluir que debe existir una relación entre la asociación de GPIIb con la chaperona BiP y la menor expresión superficial de GPIIb/IIIa. Este postulado se vería apoyado por observaciones recientes que indican que la asociación de otras proteínas con BiP causa un retardo en su maduración y su tránsito intracelular (Muresan y Arvan, 1998; Creemers *et al*, 2000). En este caso estudiado, la sobreexpresión de la proteína chaperona BiP causó un incremento de la inhibición provocada por [674R]GPIIb en la expresión del receptor. En base a nuestras observaciones, parece razonable concluir que el efecto dominante negativo de la mutación C674R es el resultado de la asociación más estable de BiP con [674R]GPIIb/IIIa, compitiendo con los complejos

normales al provocar una mayor restricción al progreso de GPIIb/IIIa a lo largo de su ruta de biosíntesis.

6- CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.-Hemos estudiado cinco familias de pacientes con diagnóstico clínico de tromboastenia de Glanzmann, en las cuales hemos hallado cuatro nuevas mutaciones, todas ellas localizadas en la subunidad GPIIb. En uno de los casos estudiados, el contenido plaquetario de GPIIb/IIIa y la estructura primaria del cDNA de ambas subunidades eran normales, por lo que la etiología de la tromboastenia habría que atribuirla a la alteración de la intercomunicación de los receptores de fibrinógeno y de los agonistas plaquetarios.

2.-El análisis cuantitativo del RNAm de GPIIb y GPIIIa en plaquetas y el estudio funcional de las mutaciones halladas demuestran que los mecanismos moleculares responsables de la falta de expresión y/o función de complejos GPIIb/IIIa han sido:

- a) Ausencia de RNAm. Las mutaciones [288delC] y Arg⁵⁹⁷→Stop de GPIIb provocan una disminución grave del contenido de RNAm en las plaquetas.
- b) Incapacidad de la subunidad mutada [324K]GPIIb para formar heterodímeros.
- c) Alteración en la velocidad de tránsito y/o ensamblaje en la membrana plasmática de complejos GPIIb/IIIa provocada por la sustitución Cys⁶⁷⁴→Arg en GPIIb.
- d) Posible alteración de los mecanismos de señalización intracelular (“Variante”).

3.-Hemos demostrado las siguientes etapas limitantes para la expresión superficial de complejos GPIIb/IIIa:

3.1.-Disponibilidad de RNA mensajero:

- a) Los individuos heterocigotos para mutaciones en GPIIb muestran reducciones de alrededor del 50% en el contenido plaquetario de GPIIb/IIIa. Estas observaciones sugieren la existencia de una correlación entre la disminución en la producción de RNAm y la tasa de expresión superficial de complejos.
- b) Existe una correlación positiva entre niveles de RNAm de GPIIb y su expresión superficial ($r= 0,68$). Esta observación indica que las variaciones en la expresión

en superficie del complejo GPIIb/IIIa son función, en gran medida, de la disponibilidad de RNAs mensajeros y de forma más evidente la de GPIIb, que controla de manera importante la expresión plaquetaria de GPIIb/IIIa en condiciones fisiológicas.

c) En la línea celular humana MEG-01, el tratamiento con ésteres de forbol induce la diferenciación megacariocítica. Este proceso se acompaña de un incremento en la expresión superficial de GPIIb/IIIa paralelo al aumento de los niveles estacionarios de mensajeros de GPIIb y GPIIIa.

3.2.-La mutación C674R de GPIIb ejerce un efecto dominante negativo sobre la expresión de subunidades normales. Este efecto es el resultado de la competición de complejos mutantes [674R]GPIIb/IIIa y normales en alguna etapa del tráfico intracelular hacia la membrana plasmática.

3.3.-La chaperona BiP del retículo endoplasmático se asocia establemente a [674R]GPIIb y a otras formas mutadas de GPIIb, pero no a las formas normales de GPIIb o GPIIIa. Esta observación permite concluir que la interacción de la chaperona BiP con las subunidades mutadas limita la expresión superficial de este receptor.

4.-Los estudios de mutagénesis de residuos específicos de GPIIb o de GPIIIa nos permiten afirmar:

4.1.-El puente disulfuro intracatenario 674-687 de GPIIb es esencial para mantener una tasa de expresión superficial de GPIIb/IIIa normal, pero no está involucrado en los procesos de activación y señalización bidireccional del receptor. La sustitución por alanina de la cisteína 687 de GPIIb, produjo efectos similares a los obtenidos con la sustitución de la cisteína 674; no obstante, el resultado aditivo de la sustitución de ambas cisteínas indica la existencia de efectos no dependientes de la sola ausencia del puente disulfuro 674-687.

4.2.-La mutagénesis del residuo 324 E de GPIIb ha demostrado que la incapacidad de [324K]GPIIb para formar heterodímeros con GPIIIa no es debida a la

ausencia de glutámico, sino a la presencia de un residuo con carga positiva en esta posición.

4.3.-Los segmentos transmembranar y citoplásmico de GPIIIa son imprescindibles para la expresión superficial normal de complejos GPIIb/IIIa.

4.4.-La delección de los residuos 616-690 del extremo carboxi-terminal extracelular de GPIIIa confiere activación constitutiva al receptor GPIIb/IIIa. Células CHO que expresan este receptor mutante se adhieren a fibrinógeno inmovilizado, se agregan espontáneamente en presencia de fibrinógeno soluble y fijan el anticuerpo monoclonal PAC-1 que reconoce específicamente epítomos solamente accesibles en el receptor plaquetario activado.

7-BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.C., Watt, F.M.: Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 1993. 117: 1183-98.
- Albelda, S.M., Buck, C.A.: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*. 1990. 4: 2868-80.
- Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A., Newman, P.J.: Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 1991. 114: 1059-68.
- Aleman, M., Concord, E., Garin, J., Vincon, M., Giles, A., Marguerie, G., Gulino, D.: Sequence 274-368 in the β_3 -subunit of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ provides a ligand recognition and binding domain for the γ -chain of fibrinogen that is independent of platelet activation. *Blood*. 1996. 87: 592-601.
- Al-Mondhiry, H., Ehmann, W.C.: Congenital afibrinogenemia. *Am J Hematol*. 1994. 46: 343-7.
- Altruda, F., Cervella, P., Tarone, G., Botta, C., Balzac, F., Stefanuto, G., Silengo L.: A human integrin β_1 with a unique cytoplasmic domain generated by alternative mRNA processing. *Gene*. 1990. 95: 261-99.
- Ambo, H., Kamata, T., Handa, M., Kawai, Y., Oda, A., Murata, M., Takada, Y., Ikeda, Y.: Novel mutations in the α_{IIb} subunit (Phe289Ser, Glu324Lys, and Gln747Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients. *Br J Haematol*. 1998. 102: 829-40.
- Ambo, H., Kamata, T., Handa, M., Taki, M., Kuwajima, M., Kawai, Y., Oda, A., Murata, M., Takada, Y., Watanabe, K., Ikeda, Y.: Three novel integrin β_3 subunit missense mutations (H280P, C560F, and G579S) in thrombasthenia, including one (H280P) prevalent in Japanese patients. *Biochem Biophys Res Com*. 1998. 251: 763-8.
- Andrews, R.K., Shen, Y., Gardiner, E.E., Dong, J.F., Lopez, J.A., Berndt, M.C.: The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost*. 1999. 82: 357-64.
- Auch, D., Reth, M.: Exontrap cloning: using PCR to rapidly detect and clone exons from genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*. 1990. 18: 6743-4.
- Bainton, D.F., Miller, L.J., Kishimoto, T.K., Springer, T.A.: Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J Exp Med*. 1987. 166: 1641-53.
- Baserga, S.J., Benz, E.J.: Nonsense mutations in the human β -globin gene affect mRNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988. 85: 2056-60.
- Behnke, O., Forer, A.: From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol*. 1998. 61: 3-23.
- Bennett, J.S., Vilaire, G., Cines, D.B.: Identification of the fibrinogen receptor on human platelets by photoaffinity labeling. *J Biol Chem*. 1982. 257: 8049-54.
- Bennett, J.S., Vilaire, G.: Exposure of platelet fibrinogen receptor by ADP and epinephrine. *J Clin Invest*. 1979. 64: 1393-1401.
- Berman, A.E., Kozlova, N.I.: Integrins: structure and functions. *Membr Cell Biol*. 2000. 13: 207-44.
- Berndt, M.C., Fournier, D.J., Castaldi, P.A.: Bernard-Soulier syndrome. *Baillieres Clin Haematol*. 1989. 2: 585-607.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L., Lose, E.J.: Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparin sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992. 8: 365-93.

- Bick, R.L., Murano, G.: Physiology of hemostasis. *Clin Lab Med.* 1994. 14: 677-707.
- Block, K.L., Poncz, M.: Platelet glycoprotein IIb gene expression as a model of megakaryocyte-specific expression. *Stem Cells.* 1995. 13: 135-45.
- Brass, L.F., Hoxie, J.A., Manning, D.R.: Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost.* 1993. 70: 217-23.
- Bray, P.F., Leung, C.S.I., Shuman, M.A.: Human platelets and megakaryocytes contain alternatively spliced glycoprotein IIb mRNAs. *J Biol Chem.* 1990. 265: 9587-90.
- Bray, P.F., Shuman, M.A.: Identification of an abnormal gene for the GPIIIa subunit of the platelet fibrinogen receptor resulting in Glanzmann's thrombasthenia. *Blood.* 1990. 75: 881-8.
- Bray, P.F.: Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 2000. 7: 284-9.
- Buck, C.A.: Immunoglobulin superfamily: structure, function and relationship to other receptor molecules. *Semin Cell Biol.* 1992. 3: 179-88.
- Burgess, J.K., Hotchkiss, K.A., Suter, C., Dudman, N.P., Szollosi, J., Chesterman, C.N., Chong, B.H., Hogg, P.J.: Physical proximity and functional association of glycoprotein Ib α and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem.* 2000. 275: 9758-66.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C.: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 1988. 4: 487-525.
- Caen, J.P., Castaldi, P.A., Leclerc, J.C., Inceman, S., Larrieu, M.J., Probst, M., Bernard, J.: Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. *Am J Med.* 1966. 41: 4-10.
- Calvete, J.J., Alvarez, M.V., Rivas, G., Hew, Ch-L., Henschen, A., González-Rodríguez, J.: Interchain and intrachain disulfide bonds in human platelet glycoprotein IIb. Localization of epitopes for several monoclonal antibodies. *Biochem J.* 1989. 261: 551-60.
- Calvete, J.J., Arias, J., Alvarez, M.V., Lopez, M.M., Henschen, A., Gonzalez-Rodriguez, J.: Further studies on the topography of the N-terminal region of human platelet glycoprotein IIIa. Localization of monoclonal antibody epitopes and the putative fibrinogen-binding sites. *Biochem J.* 1991. 274: 457-63.
- Calvete, J.J., Henschen, A., González-Rodríguez, J.: Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the β -subunits of the integrin family. *Biochem J.* 1991. 274: 63-71.
- Calvete, J.J., Henschen, A., González-Rodríguez, J.: Complete localization of the intrachain disulphide bonds and the N-glycosylation points in the α -subunit of the human platelet glycoprotein IIb. *Biochem J.* 1989. 261: 561-8.
- Calvete, J.J.: On the structure and function of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995. 208: 346-60.
- Clemetson, K.J.: Platelet GPIb-V-IX complex. *Thromb Haemost.* 1997. 78: 266-70.
- Coller, B.S., Chersh, D.A., Asch, E., Seligsohn, U.: Platelet vitronectin receptor expression differentiates Iraqi-Jewish from Arab patients with Glanzmann thrombasthenia in Israel. *Blood.* 1991. 77: 75-83.
- Coller, B.S., Peerschke, E.I., Scudder, L.E., Sullivan, C.A.: A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest.* 1983. 72: 325-38.

- Coller, B.S., Scudder, L.E., Beer, J., Gold, H.K., Folts, J.D., Cavagnaro, J., Jordan, R., Wagner, C., Iulucci J., Knight, D., Ghrayeb, J., Smith, C., Weisman, H., Berger H.: Monoclonal antibodies to platelet GPIIb/IIIa as antithrombotic agents. *Ann N Y Acad Sci.* 1991. 614: 193-213.
- Coller, B.S., Seligsohn, U., Little P.A.: Type I Glanzmann thrombasthenia patients from the Iraqi-Jewish and Arab populations in Israel can be differentiated by platelet glycoprotein IIIa immunoblot analysis. *Blood.* 1987. 69: 1696-1703.
- Coller, B.S., Seligsohn, U., Peretz, H., Newman, P.J.: Glanzmann thrombasthenia: new insights from an historical perspective. *Semin Hematol.* 1994. 31: 301-11.
- Cooper, D.N.: Human gene mutations affecting RNA processing and translation. *Ann Med.* 1993. 25: 11-17.
- Coppolino, M., Leung-Hagesteijn, C., Dedhar, S., Wilkins, J.: Inducible interaction of integrin $\alpha_2\beta_1$ with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem.* 1995. 270: 23132-8.
- Creemers, J.W., van De Loo, J.W., Plets, E., Hendershot, L.M., Van De Ven, W.J.: Binding of BiP to the processing enzyme lymphoma proprotein convertase prevents aggregation, but slows down maturation. *J Biol Chem.* 2000. 275: 38842-7.
- Charo, I.F., Nannizzi, L., Phillips, D.R., Hsu, M.A., Scarborough, R.M.: Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J Biol Chem.* 1991. 266: 1415-21.
- Chomczynsky, P., Sachi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987. 162: 156-9.
- Chung, J., Gao, A.G., Frazier, W.A.: Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem.* 1997. 272: 14740-6.
- Davies, M.J.: Pathology of arterial thrombosis. *Br Med Bull.* 1994. 50: 789-802.
- De Vreker, R.A., De Vreker, G.G.: Aspects of platelet metabolism during aggregation. *Thromb Diath Haemorrh Suppl.* 1965. 17: 237-41.
- Defilippi, P., Truffa, G., Stefanuto, G., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G.: Tumor necrosis factor α and interferon γ modulate the expression of the vitronectin receptor (integrin β_3) in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1991. 266: 7638-45.
- Dhermy, D., Burnier, O., Bourgeois, M., Grandchamp, B.: The red blood cell band 3 variant (band 3Biceetrel:R490C) associated with dominant hereditary spherocytosis causes defective membrane targeting of the molecule and a dominant negative effect. *Mol Membr Biol.* 1999. 16: 305-12.
- Dickeson, S.K., Santoro, S.A.: Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *Cell Mol Life Sci.* 1998. 54: 556-66.
- Dietz, H.C., Valle, D., Francomano, C.A., Kenzior, R.J.Jr, Pyeritz, R.E., Cutting G.R.: The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science.* 1993. 259: 680-3.
- Djaffar, I., Caen, J.P., Rosa, J.P.: A large alteration in the human glycoprotein IIIa (integrin β_3) gene associated with Glanzmann's thrombasthenia. *Hum Mol Genet.* 1993. 2: 2183-5.
- D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H., Burke, T.A., Lam, S.C., Plow, E.F.: Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science.* 1988. 242: 91-3.
- D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H., Burke, T.A., Plow, E.F.: The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its α subunit. *J Biol Chem.* 1990. 265: 3440-6.

- D'Souza, S.E., Haas, T.A., Piotrowicz, R.S., Byers-Ward, V., McGrath, D.E., Soule, H.R., Cierniewski, C., Plow, E.F., Smith J.W.: Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin β_3 subunit: Cation displacement is involved in ligand binding. *Cell*. 1994. 79: 659-67.
- Du, X.P., Plow, E.F., Frelinger, A.L., O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H.: Ligands "activate" integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$ (platelet GPIIb-IIIa). *Cell*. 1991. 65: 409-16.
- Duperray, A., Troesch, A., Berthier, R., Chagnon, E., Frchet, P., Uzan, G., Marguerie, G.: Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood*. 1989. 74: 1603-11.
- Eigenthaler, M., Hofferer, L., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H.: A conserved sequence motif in the integrin β_3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with β_3 -endoneixin. *J Biol Chem*. 1997. 272: 7693-8.
- Falk, E., Fernandez-Ortiz, A.: Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Amer J Cardiol*. 1995. 75: 3B-11B.
- Farrell, D.H., Thiagarajan, P., Chung, D.W., Davie, E.W.: Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992. 89: 10729-32.
- Farrell, D.H., Thiagarajan, P.: Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem*. 1994, 269: 226-231.
- Faull, R.J., Ginsberg, M.H.: Dynamic regulation of integrins. *Stem Cells*. 1995. 13: 38-46.
- Ferrer, M., Fernández-Pinel, M., González-Manchón, C., González, J., Ayuso, M.S., Parrilla, R.: A mutant (Arg³²⁷→His)GPIIb associated with thrombasthenia exerts a dominant negative effect in stably transfected CHO cells. *Throm Haemost*. 1996. 76: 292-301.
- Ferrer, M., Tao, J., Iruín, G., Sánchez-Ayuso, M., González-Rodríguez, J., Parrilla, R., González-Manchón, C.: Truncation of GPIIIa (Δ 616-762) prevents complex formation with GPIIb. Novel mutation in exon 11 of GPIIIa associated with thrombasthenia. *Blood*. 1998. 92: 4712-20.
- Fitzgerald, L.A., Phillips, D.R.: Calcium regulation of the platelet membrane glycoprotein IIB-IIIa complex. *J Biol Chem*. 1985. 260: 11366-76.
- Fitzgerald, L.A., Steiner, B., Rall, S.C., Lo, S.S., Phillips D.R.: Protein sequence of endothelial cell glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity with "integrin". *J Biol Chem*. 1987. 262: 3936-9.
- Folts, J.D., Gallagher, K., Rowe G.G.: Blood flow reduction in stenosed canine coronary arteries: vasoospasm or platelet aggregation. *Circulation*. 1982. 65: 248-55.
- Fong, S., Jones, S., Renz, M.E., Chiu, H.H., Ryan, A.M., Presta, L.G., Jackson, D.: Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). Its binding motif for $\alpha_4\beta_7$ and role in experimental colitis. *Immunol Res*. 1997. 16: 299-311.
- Frchet, P., Uzan, G., Thevenon, D., Denarier, E., Prandini, M.H., Marguerie, G.: GPIIb and GPIIIa amino acid sequences deduced from human megakaryocyte cDNAs. *Mol Biol Rep*. 1990. 14: 27-33.
- Frattali, A.L., Treadway, J.L., Pessin, J.E.: Insulin/IGF-1 hybrid receptors: implications for the dominant negative phenotype in syndromes of insulin resistance. *J Cell Biochem*. 1992. 48: 43-50.
- French, D.L., Chen, F.P., Xu, L., Weiss, H.J., Collier, B.S.: Two unrelated doubly heterozygous patients with Glanzmann thrombasthenia have the same GPIIb mutation resulting in loss of the transmembrane domain. *Thromb Haemost*. 1997. 77: 360 (abstract).
- French, D.L.: The molecular genetics of Glanzmann's thrombasthenia. *Platelets*. 1998. 9: 5-20.

- George, J.N., Caen, J.P., Nurden, A.T.: Glanzmann's thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. *Blood*. 1990. 75: 1383-95.
- George, J.N.: Platelets. *The Lancet*. 2000. 355: 1531-9.
- Ginsberg, M.H., Forsyth, J., Lightsey, A., Chediak, J., Plow, E.F.: Reduced surface expression and binding of fibronectin by thrombin-stimulated thrombasthenic platelets. *J Clin Invest*. 1983. 71: 619-24.
- Glanzmann, E.: Hereditäre hemorrhagische thrombasthenie: ein beitrage zur pathologie der blut plattchen. *J Kinderke*. 1918. 88: 1-13.
- González-Rodríguez, J., Acuña, A.U., Alvarez, M.V., Jovin, T.M.: Rotational mobility of the fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa or integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in the plasma membrane of human platelets. *Biochemistry*. 1994. 33: 266-74.
- Graham, F.L., van der Eb, A.J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus. *Virology*. 1973. 52: 456-67.
- Gray, A.J., Reeves, J.T., Harrison, N.K., Winlove, P., Laurent, G.J.: Growth factors for human fibroblasts in the solute remaining after clot formation. *J Cell Sci*. 1990. 96: 271-4.
- Grimaldi, C.M., Chen, F., Scudder, L.E., Coller, B.S., French, D.L.: A Cys374Tyr homozygous mutation of platelet glycoprotein IIIa (β_3) in a chinese patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*. 1996. 88: 1666-75.
- Gu, J.M., Xu, W.F., Wang, X.D., Wu, Q.Y., Chi, C.W., Ruan, C.G.: Identification of a nonsense mutation at amino acid 584-arginine of platelet glycoprotein IIb in patients with type I Glanzmann thrombasthenia. *Br J Haematol*. 1993. 83: 442-9.
- Gulick, T.: Transfection using DEAE-dextran. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA. 1997. Vol 1. p 9.2.1.
- Gurney, A.L., Carver-Moore, K., De Sauvage, F. J., Moore, M.W.: Thrombocytopenia in c-mpl deficient mice. *Science*. 1994. 265: 1445-7.
- Hagan, K.W., Ruiz-Echevarria, M.J., Quan, Y., Peltz, S.W.: Characterization of cis-acting sequences and decay intermediates involved in nonsense-mediated mRNA turnover. *Mol Cell Biol*. 1995. 15: 809-23.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppelino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., Dedhar, S.: Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β_1 -integrin-linked protein kinase. *Nature*. 1996. 379: 91-6.
- Harrison, P., Cramer, E.M.: Platelet α -granules. *Blood Rev*. 1993. 7: 52-62.
- Heidenreich, R., Eisman, R., Surrey, S., Delgrosso, K., Bennett, J.S., Schwartz, E., Poncz, M.: Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry*. 1990. 29: 1232-44.
- Heino, J., Ignatz, R.A., Hemler, M.E., Crouse, C., Massague, J.: Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . Concomitant regulation of integrins that share a common β_1 subunit. *J Biol Chem*. 1989. 264: 380-8.
- Hellman, R., Vanhove, M., Lejeune, A., Stevens, F.J., Hendershot, L.M.: The *in vivo* association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. *J Cell Biol*. 1999. 144: 21-30.

- Hendershot, L.M., Ting, J., Lee, A.S.: Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton Glucose-Regulated Protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol Cell Biol.* 1988. 8: 4250-6.
- Hermanowski-Vosatka, A., Van Strijp, J.A., Swiggard, W.J., Wright, S.D.: Integrin modulating factor-1: a lipid that alters the function of leukocyte integrins. *Cell.* 1992. 68: 341-52.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A., Laurent, G.: Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999. 31: 741-6.
- Hershkowitz, I.: Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature.* 1987. 329: 219-22.
- Hogervorst, F., Kuikman, I., van Kessel, A.G., Sonnenberg, A.: Molecular cloning of the human α_6 integrin subunit. Alternative splicing of α_6 mRNA and chromosomal localization of the α_6 and β_4 genes. *Eur J Biochem.* 1991. 199: 425-33.
- Honda, S., Tomiyama, Y., Shiraga, M., Tadokoro, S., Takamatsu, J., Saito, H., Kurata, Y., Matsuzawa, Y.: A two-amino acid insertion in the Cys146- Cys167 loop of the α_{IIb} subunit is associated with a variant of Glanzmann thrombasthenia. Critical role of Asp163 in ligand binding. *J Clin Invest.* 1998. 102: 1183-92.
- Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., Weghorst, C.M.: "Cold SSCP": a simple rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21:3637-42.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R.: Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 1989. 77: 61-8.
- Hotchin, N.A., Hall, A.: Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv.* 1996. 27: 311-22.
- Houdijk, W.P., Sixma, J.J.: Fibronectin in artery subendothelium is important for platelet adhesion. *Blood.* 1985. 65: 598-604.
- Hu, D.D., White, C.A., Panzer-Knodle, S., Page, J.D., Nicholson, N., Smith, J.W.: A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem.* 1999. 274: 4633-9.
- Hughes, P.E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H.: Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem.* 1996. 271: 6571-4.
- Hynes, R.O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992. 69: 11-25.
- Hynes, R.O.: The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost.* 1991. 66: 40-3.
- Ignatz, R.A., Heino, J., Massague, J.: Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. *J Biol Chem.* 1989. 264: 389-92.
- Isberg, R.R., Leong, J.M.: Multiple β_1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 1990. 60: 861-871.
- Iwamoto, S., Nishiumi, E., Kajii, E., Ikemoto, S.: An exon 28 mutation resulting in alternative splicing of the glycoprotein IIb transcript and Glanzmann's thrombasthenia. *Blood.* 1994. 83: 1017-23.
- Jennings, L.K., Phillips, D.R.: Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J Biol Chem.* 1982. 257: 10458-66.

- Johnston ,G.I., Cook ,R.G., McEver ,R.P.: Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell*. 1989. 56: 1033-44.
- Judson, P.A., Anstee, D.J., Clamp, J.R.: Isolation and characterization of the major oligosaccharide of human platelet membrane glycoprotein GPIb. *Biochem J*. 1982. 205: 81-90.
- Kamata T., Puzon W. y Takada Y.: Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2,CD49b/CD29). *J Biol Chem*. 1994, 269:9659-63.
- Kamata, T., Irie, A., Tokuhira, M., Takada, Y.: Critical residues of integrin α_{IIb} subunit for binding of $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb-IIIa) to fibrinogen and ligand-mimetic antibodies (PAC-1, OP-G2, and LJ-CP3). *J Biol Chem*. 1996. 271: 18610-5.
- Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Tadokoro, S., Honda, S., Shiraga, M., Mizutani, H., Handa, M., Kurata, Y., Matsuzawa, Y., Shattil, S.J.: A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the β_3 subunit activates integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$. *Blood*. 1999. 93: 2559-68.
- Kato, A., Yamamoto, K., Miazaki, S., Jung, S.M., Moroi, M., Aoki, N.: Molecular basis for Glanzmann's thrombasthenia (GT) in a compound heterozygote with glycoprotein IIb gene: A proposal for classification of GT based on the biosynthetic pathway of glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*. 1992. 79: 3212-8.
- Kaushansky, K.: Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995. 86: 419-31.
- Kincade, P.W., He, Q., Ishuhara, K., Miyake, K., Lesley, J., Hyman, R.: CD44 and other cell interaction molecules contributing B-lymphopoiesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1993. 184: 215-22.
- Kirchhofer, D., Grzesiak, J., Pierschbacher, M.D.: Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*. 1991. 266: 4471-7.
- Kirchhofer, D., Languino, L.R., Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D.: $\alpha_2\beta_1$ integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem*. 1990. 265: 615-8.
- Kloczewiak, M., Timmons, S., Hawiger, J.: Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen γ chain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982. 107: 181-7.
- Kolodziej, M.A., Vilaire, G., Rifat, S., Poncz, M., Bennett, J.S.: Effect of deletion of glycoprotein IIb exon 28 on the expression of the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood*. 1991. 78: 2344-53.
- Komoriya, A., Green, L.J., Mervic, M., Yamada, S.S., Yamada, K.M., Humphries, M.J.: The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem*. 1991. 266: 15075-9.
- Kraft, S., Diefenbach, B., Mehta, R., Jonczyk, A., Luckenbach, G.A., Goodman, S.L.: Definition of an unexpected ligand recognition motif for $\alpha_v\beta_6$ integrin. *J Biol Chem*. 1999. 274: 1979-85.
- Kucik, D.F., Dustin, M.L., Miller, J.M., Brown, E.J.: Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest*. 1996. 97: 2139-44.
- Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K.A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F., Jackson, S.P.: A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. 2000. 105: 783-91.

- Kumar, C.S., James, I.E., Wong, A., Mwangi, V., Feild, J.A., Nuthulaganti, P., Connor, J.R., Eichman, C., Ali, F., Hwang, S.M., Rieman, D.J., Drake, F.H., Gowen, M.: Cloning and characterization of a novel integrin β_3 subunit. *J Biol Chem.* 1997. 272: 16390-7.
- Lanza, F., Kieffer, N., Phillips, D.R., Fitzgerald, L.A.: Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene: comparison to the fibronectin receptor β -subunit gene. *J Biol Chem.* 1990. 265: 18098-103.
- Lasky, L.A.: Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science.* 1992. 258: 964-9.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R.: Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell.* 1995. 80: 631-8.
- Li, L., Bray, P.F.: Homologous recombination among three intragene Alu sequences causes an inversion-deletion resulting in the hereditary bleeding disorder Glanzmann thrombasthenia. *Am J Hum Genet.* 1993. 53: 140-9.
- Lincoff, A.M., Califf, R.M., Anderson, K.M., Weisman, H.F., Aguirre, F.V., Kleiman, N.S., Harrington, R.A., Topol, E.J.: Evidence for prevention of death and myocardial infarction with platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by abciximab (c7E3 Fab) among patients with unstable angina undergoing percutaneous coronary revascularization. EPIC investigators. Evaluation of 7E3 in Preventing Ischemic Complications. *J Am Coll Cardiol.* 1997. 30: 149-156.
- Liu, C.Y., Sun, Q.H., Wang, R., Paddock, C.M., Newman, P.J.: Further examination of the role of GPIIIa long-range Cys5-Cys435 disulfide bond in conformational changes of GPIIb-IIIa: substitution of cysteine 5 with alanine results in the production of a constitutively active GPIIb-IIIa integrin complex. *Blood.* 1998. 92: 1413 (abstract).
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Deetz, K.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic.* 1995. 4: 357-62.
- Loftus, J.C., Liddington, R.C.: New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 1997. 99: 2302-6.
- Loftus, J.C., O'Toole, T.E., Plow, E.F., Glass, A., Frelinger, A.L. 3d, Ginsberg, M.H.: A β_3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science.* 1990. 249: 915-8.
- Loike, J.D., Sodeik, B., Cao, L., Leucona, S., Weitz, J.I., Detmers, P.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C.: CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N-terminus of the $\text{A}\alpha$ chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. 88: 1044-8.
- MacGregor, G.R., Nolan, G.P., Fiering, S., Roederer, M., Herzenberg, L.A.: Use of E.coli lacZ (β -galactosidase) as a reporter gene. *Methods in Molecular Biology.* The Human Press Inc., Clifton, NJ. 1991. Vol7: Gene transfer and expression protocols.
- Marcus, A.J., Zucker-Franklin, D., Safier, L.B., Ullman, H.L.: Studies on human platelet granules and membranes. *J Clin Invest.* 1966. 45: 14-28.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S.: Construction of T-vector, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19: 1154.
- Marlin, S.D., Springer, T.A.: Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA). *Cell.* 1987. 51: 813-9.
- Masuda, C.A., Montero-Lomeli, M.: An NH₂-terminal deleted plasma membrane H⁺-ATPase is a dominant negative mutant and is sequestered in endoplasmic reticulum derived structures. *Biochem Cell Biol.* 2000. 78: 51-8.

- McNicol, A., Israels, S.J.: Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1999. 95: 1-18.
- Méndez, J.A., Alvarez, M.V., Aznarez, J.A., González-Rodríguez, J.: Twofold symmetry of human fibrinogen proved at the β -chain distal domains by monoclonal immunoelectron microscopy and image analysis. *Biochemistry.* 1996. 35: 634-7.
- Meyer, B.J., Badimon, J.J., Maihac, A., Fernández-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Fuster, V., Badimon, L. Inhibition of growth of thrombus on fresh mural thrombus: targeting optimal therapy. *Circulation.* 1994. 90: 2432-8.
- Milet, S., Bourre, F., Peyruchaud, O., Cazes, E., Combrie, R., Nurden, P., Nurden, A.T.: Amino acid substitution Cys⁴⁵⁷ to Tyr in the β_3 subunit of $\alpha_{IIb}\beta_3$ is involved in an atypical case of Glanzmann thrombasthenia. *Throm Haemost.* 1997. 77: 360 (abstract).
- Milet, S., Nurden, P., Combrié, R., Nurden, A.T., Bourre, F.: Amino acid requirement in position 324 of the α_{IIb} subunit for a normal cell membrane expression of the fibrinogen receptor of platelets. *Throm Haemost.* 1999. Supp 1999: (abstract 1598) p498.
- Mizuno, M., Fujisawa, R., Kuboki, Y.: Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha_2\beta_1$ integrin interaction. *J Cell Physiol.* 2000. 184: 207-13.
- Morelle, G.: A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus.* 1989. 11: 7-8.
- Mould, A.P., Askari, J.A., Aota, S., Yamada, K.M., Irie, A., Takada, Y., Mardon, H.J., Humphries M.J.: Defining the topology of $\alpha_5\beta_1$ fibronectin interactions using inhibitory anti- α_5 and anti- β_1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the α_5 subunit. *J Biol Chem.* 1997. 272: 17283-92.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H.A.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1986. 51: 263-73.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Wu, R. ed. *Methods in Enzymology.* Vol 155, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987. p335-350.
- Muresan, Z., Arvan, P.: Enhanced binding to the molecular chaperone BiP slows thyroglobulin export from the endoplasmic reticulum. *Mol Endocrinol.* 1998. 12: 458-67.
- Nagaya, T., Jameson, J.L.: Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance. *J Biol Chem.* 1993. 268: 15766-71.
- Naik, U.P., Patel, P.M., Parise, L.V.: Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin α_{IIb} cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 1997. 272: 4651-4.
- Newman, P.J., Seligsohn, U., Lyman, S., Coller, B.S.: The molecular genetic basis of Glanzmann thrombasthenia in the Iraqi-Jewish and Arab populations in Israel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. 88: 3160-4.
- Nichols, W.C., Ginsburg, D.: von Willebrand disease. *Medicine (Baltimore).* 1997. 76: 1-20.
- Niiya, K., Hodson, E., Bader, R., Byers-Ward, V., Koziol, J.A., Plow, E.F., Ruggeri, Z.M.: Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood.* 1987. 70: 475-83.
- Nurden, A.T., Caen, J.P.: An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol.* 1974. 28: 253-60.

- Nurden, A.T., Caen, J.P.: Role of surface glycoproteins in human platelet function. *Thromb Haemost.* 1976. 35: 139-50.
- Oates, J.A., Fitzgerald, G.A., Branch, R.A., Jackson, E.K., Knapp, H.R., Roberts, L.J.: Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation. *N Engl J Med.* 1988. 319: 761-7.
- Ogura, M., Morishima, Y., Ohno, R., Kato, Y., Hirabayasi, N., Nagura, H., Saito, H.: Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1985. 66: 1384-92.
- Ogura, M., Morishima, Y., Okumura, M., Hotta, T., Takamoto, S., Ohno, R., Hirabayasi, N., Nagura, H., Saito, H.: Functional and morphological differentiation induction of a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01s) by phorbol diesters. *Blood.* 1988. 72: 49-60.
- O'Neill, S., Robinson, A., Deering, A., Ryan, M., Fitzgerald, D.J., Moran, N.: The platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem.* 2000. 275: 36984-90.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hyashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86: 2766-70.
- Osborn, L., Vassallo, C., Browning, B.G., Tizard, R., Haskard, D.O., Benjamin, C.D., Douglas, I., Kirchhausen, T.: Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$). *J Cell Biol.* 1994. 124: 601-8.
- O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H.: Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol.* 1994. 124: 1047-59.
- O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Plow, E.F., Glass, A.A., Harper, J.R., Ginsberg, M.H.: Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits. *Blood.* 1989. 74: 14-18.
- O'Toole, T.E., Ylanne, J., Culley, B.M.: Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the β subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 1995. 270: 8553-8.
- Parise, L.V., Criss, A.B., Nannizzi, L., Wardell, M.R.: Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood.* 1990. 75: 2363-8.
- Parise, L.V., Phillips, D.R.: Fibronectin-binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* 1986. 261: 14011-7.
- Parrilla, R., Mixson, J., McPherson, J., McClaskey, J.: Characterization of seven novel mutations of the c-erbA- β gene in patients with generalized thyroid hormone resistance. Evidence for two "hot spot" regions of the ligand binding domain. *J Clin Invest.* 1991. 88 :2123-30.
- Parsons, J.T.: Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996. 8: 146-52.
- Peerschke, E.I., Zucker, M.B., Grant, R.A., Egan, J.J., Johnson, M.M.: Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood.* 1980. 55: 841-7.
- Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 1984. 309: 30-3.
- Plow, E.F., D'Souza, S.E., Ginsberg M.H.: Consequences of the interaction of platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) and its ligands. *J Lab Clin Med.* 1992. 120: 198-204.
- Poncz, M., Eisman, R., Heidenreich, R., Silver, S.M., Vilaire, G., Surrey, S., Schwartz, E., Bennett, J.S.: Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb: homology to the α subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem.* 1987. 262: 8476-82.

- Poncz, M., Rifat, S., Collier, B.S., Newman, P.J., Shattil, S.J., Parrella, T., Fortina, P., Bennett, J.S.: Glanzmann thrombasthenia secondary to a Gly²⁷³→Asp mutation adjacent to the first calcium-binding domain of platelet glycoprotein IIb. *J Clin Invest.* 1994. 93: 172-179
- Ponte, P., Nag, S.Y., Engel, J., Gunning, P., Kedes, L.: Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human β -actin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1984. 12: 1687-96.
- Pujades, C., Alon, R., Yauch, R.L., Masumoto, A., Burkly, L.C., Chen, C., Springer, T.A., Lobb, R.R., Hemler, M.E. : Defining extracellular integrin α -chain sites that affect cell adhesion and adhesion strengthening without altering soluble ligand binding. *Mol Biol Cell.* 1997. 8: 2647-57.
- Rao, A.K.: Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion. *Am J Med Sci.* 1998. 316: 69-76.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen K., Wright, S.D.: Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 1990. 61: 1375-82.
- Rink, T.J., Sage, S.O.: Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol.* 1990. 52: 431-49.
- Ruan, J., Peyruchaud, O., Alberio, L., Valles, G., Clemetson, K., Bourre, F., Nurden A.T.: Double heterozygosity of the GPIIb gene in a Swiss patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol.* 1998. 102: 918-25.
- Ruan, J., Schmugge, M., Clemetson, K.J., Cazes, E., Combrie, R., Bourre, F., Nurden, A.T.: Homozygous Cys⁵⁴²→Arg substitution in GPIIIa in a swiss patient with type I Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol.* 1999. 105: 523-31.
- Ruggeri, Z.M.: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in the initiation of platelet adhesion to thrombogenic surfaces. *Thromb Haemost.* 1995. 74: 460-3.
- Sakariassen, K.S., Nievelstein, P.F., Collier, B.S., Sixma, J.J.: The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol.* 1986. 63: 681-91.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977. 74: 5463-7.
- Sastry, S.K., Horwitz, A.F.: Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response. *Dev Biol.* 1996. 180: 455-67.
- Sastry, S.K., Horwitz, A.F.: Integrin cytoplasmic domain: mediators of cytoskeletal linkages and extra-intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 1993. 5: 819-31.
- Savage, B., Bottini, E., Ruggeri, Z.M.: Interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem.* 1995. 270: 28812-7.
- Schlegel, N., Gayet, O., Morel-Kopp, M.C., Wyler, B., Hurtaud-Roux, M.F., Kaplan, C., Mc Gregor, J.: The molecular genetic basis of Glanzmann's thrombasthenia in a gypsy population in France: identification of a new mutation on the α_{IIb} gene. *Blood.* 1995. 86: 977-82.
- Schwartz, M.A., Ingber, D.E., Lawrence, M., Springer, T.A., Lechene, C.: Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res.* 1991. 195: 533-5.
- Schwartz, M.A., Schaller, M.D., Ginsberg, M.H.: Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995. 11: 549-99.
- Seckler, R., Jaenicke, R.: Protein folding and protein refolding. *FASEB J.* 1992. 6: 2545-52.

- Seligsohn, U., Rososhansky, S.: A Glanzmann's thrombasthenia cluster among Iraqi Jews in Israel. *Thromb Haemost.* 1984. 52: 230-1.
- Shattil, S.J., Bennett, J.S.: Platelets and their membranes in hemostasis: physiology and pathophysiology. *Ann Intern Med.* 1981. 94: 108-18.
- Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M., Brass, L.F.: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985. 260: 11107-14.
- Shattil, S.J., O'Toole, T., Eigenthaler, M., Thon, V., Williams, M., Babior, B.M., Ginsberg, M.H.: β_3 -endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin β_3 subunit. *J Cell Biol.* 1995. 131: 807-16.
- Shattil, S.J.: Signaling through platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999. 82: 318-25.
- Shou, Y., Baron, S., Poncz, M.: An Sp1-binding silencer element is a critical negative regulator of the megakaryocyte-specific α_{IIb} gene. *J Biol Chem.* 1998. 273: 5716-26.
- Sixma, J.J., Wester, J.: The hemostatic plug. *Semin Hematol.* 1977. 14: 265-99.
- Springer, T.A.: Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α -subunits into a β -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997. 94: 65-72.
- Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991. 251: 1451-5.
- Tamura, R.N., Cooper, H.M., Collo, G., Quaranta V.: Cell type-specific integrin variants with alternative α chain cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. 88: 10183-7.
- Tamura, R.N., Rozzo, C., Starr, L.: Epithelial integrin $\alpha_6\beta_4$: complete primary structure of α_6 and variant forms of β_4 . *J Cell Biol.* 1990. 111: 1593-1604.
- Thornton, M.A., Ponz, M., Korostishevsky, M., Yakobson, E., Usher, S., Seligsohn, U., Peretz, H.: The human platelet α_{IIb} gene is not closely linked to its integrin partner β_3 . *Blood.* 1999. 94: 2039-47.
- Tomiyama, Y., Kashiwagi, H., Kosugi, S., Shiraga, M., Kanayama, Y., Kurata, Y., Matsuzawa, Y.: Abnormal processing of the glycoprotein IIb transcript due to a nonsense mutation in exon 17 associated with Glanzmann's thrombasthenia. *Thromb Haemost.* 1995. 74: 811.
- Topol, E.J., Ferguson, J.J., Weisman, H.F., Tchong, J.E., Ellis, S.G., Kleiman, N.S., Ivanhoe, R.J., Wang, A.L., Miller, D.P., Anderson, K.M., Califf, R.M.: Long-term protection from myocardial ischemic events in a randomized trial of brief integrin β_3 blockade with percutaneous coronary intervention. EPIC investigator group. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibition for Prevention of Ischemic Complication. *JAMA.* 1997. 278: 479-84.
- Tozer E.C., Liddington R.C., Sutcliffe M.J., Smeeton A.H. y Loftus J.C.: Ligand binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is dependent of a MIDAS-like domain in the β_3 subunit. *J Biol Chem.* 1996, 271:21978-84.
- Ugarova, T.P., Budzynski, A.Z., Shattil, S.J., Ruggeri, Z.M., Ginsberg, M.H., Plow E.F.: Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa. *J Biol Chem.* 1993. 268: 21080-7.
- Unger, T., Mietz, J.A., Scheffner, M., Yee, C.L., Howley, P.M.: Functional domains of wild type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation transdominant inhibition and transformation suppression. *Mol Cell Biol.* 1993. 13: 5186-94.

- Uzan, G., Prenant, M., Prandini, M.H., Martin, F., Marguerie, G.: Tissue-specific expression of the platelet GPIIb gene. *J Biol Chem.* 1991. 266: 8932-9.
- van Kuppevelt, T.H., Languino, L.R., Gailit, J.O., Suzuki, S., Ruoslahti, E.: An alternative cytoplasmic domain of the integrin β_3 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86: 5415-8.
- van Willigen, G., Hers, I., Gorter, G., Akkerman, J.W.: Exposure of ligand-binding sites on platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ by phosphorylation of the β_3 subunit. *Biochem J.* 1996. 314: 769-79.
- Villa-García, M., Li, L., Riely, G., Bray, P.F.: Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human β_3 integrin gene. *Blood.* 1994. 83: 668-76.
- Vinciguerra, C., Khelif, A., Alemany, M., Morle, F., Grenier, C., Uzan, G., Guling, D., Dechavanne, M., Negrier C.: A nonsense mutation in the GPIIb heavy chain (Ser⁸⁷⁰→stop) impairs platelet GPIIb-IIIa expression. *Br J Haematol.* 1996. 95: 399-407.
- Vinciguerra, C., Trzeciak, M.C., Philippe, N., Frappaz, D., Reynaud, J., Dechavanne, M., Negrier, C.: Molecular study of Glanzmann thrombasthenia in 3 patients issued from 2 different families. *Thromb Haemost.* 1995. 74: 822-7.
- Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Coller, B.S., Jordan, R.E.: Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood.* 1996. 88: 907-14.
- Wang, R., Peterson, J., Aster, R.H., Newman, P.J.: Disruption of a long-range disulfide bond between residues Cys⁴⁰⁶ and Cys⁶⁵⁵ in glycoprotein IIIa does not affect the function of platelet glycoprotein IIb-IIIa. *Blood.* 1997. 90: 1718-9.
- Weiss, H.J.: Scott syndrome: a disorder of platelet coagulant activity. *Semin Hematol.* 1994. 31: 312-9.
- Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E., Damsky, C.H.: Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol.* 1989. 109: 877-89.
- White, J.G.: An overview of platelet structural physiology. *Scanning Microsc.* 1987. 1: 1677-700.
- Wilcox, D.A., Wautier, J.L., Pidard, D., Newman, P.J.: A single amino acid substitution flanking the fourth calcium binding domain of α_{IIb} prevents maturation of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin complex. *J Biol Chem.* 1994. 269: 4450-7.
- Wilhide, C.C., Jin, Y., Guo, Q., Li, L., Li, S.X., Rubin, E., Bray, P.F.: The human integrin β_3 gene is 63 kb and contains a 5'-UTR sequence regulating expression. *Blood.* 1997. 90: 3951-61.
- Williams, M.J., Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H.: The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* 1994. 4: 109-12.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Wallace, R.B.: Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86: 2757-60.
- Xia, Z., Wong, T., Liu, Q., Kasirer-Friede, A., Brown, E., Frojmovic, M.M.: Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br J Haematol.* 1996. 93: 204-14.
- Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R.L., Owens, R.T., Keene, D.R., Mayne, R., Hook, A., Hook, M.: Multiple binding sites in collagen type I for the integrins $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$. *J Biol Chem.* 2000. 275: 38981-9.
- Yamada, K.M., Miyamoto, S.: Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* 1995. 7: 681-9.

- Yasuda, T., Gold, H.K., Leimbach, R.C., Saito, T., Guerrero, J.L., Jange, I.K., Holt, R., Fallon, J.T., Collen, D.: Lysis of plasminogen activator-resistant platelet-rich coronary artery thrombus with combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and anti-platelet GPIIb-IIIa antibody. *J Am Coll Cardiol.* 1990. 16: 1728-35.
- Yokosaki, Y., Matsuura, N., Higashiyama, S., Murakami, I., Obara, M., Yamakido, M., Shigeto, N., Chen, J., Sheppard, D.: Identification of the ligand binding site for the integrin $\alpha_9\beta_1$ in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C. *J Biol Chem.* 1998. 273: 11423-8.
- Zimrin, A.B., Gidwitz, S., Lord, S., Schwartz, E., Bennett, J.S., White, G.C. 2d, Poncz, M.: The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *J Biol Chem.* 1990. 265: 8590-5.
- Zucker, M.B., Pert, J.H., Hilgartner, M.W.: Platelet function in a patient with thrombastenia. *Blood.* 1966. 28: 524-34.
- Zucker, M.B.: Platelet adhesion, release and aggregation. *Throm Diath Haemorrh.* 1964. 13: 301.